



Bachelorarbeit

Eric Fritzsche

**Untersuchungen zum Einfluss
von Phytohormonen und
Stresssubstanzen auf die
Harpagosidbildung der
Teufelskralle**

Mittweida, 2014

Bachelorarbeit

Untersuchungen zum Einfluss von Phytohormonen und Stresssubstanzen auf die Harpagosidbildung der Teufelskralle

Autor:

Eric Fritzsche

Studiengang:
Biotechnologie/Bioinformatik

Seminargruppe:
BI11w2-B

Erstprüfer:
Prof. Dr. Röbbbe Wünschiers

Zweitprüfer:
Dr. Swetlana König

Einreichung:
Mittweida, 25.07.2014

Verteidigung/Bewertung:
Mittweida, 2014

Bibliographische Beschreibung:

Fritzsche, Eric: Untersuchungen zum Einfluss von Phytohormonen und Stresssubstanzen auf die Harpagosidbildung der Teufelskralle. - 2014. - 8, 55, 15 S. Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Mathematik/Naturwissenschaften/Informatik, Bachelorarbeit, 2014

Englischer Titel

Investigations on the influence of phytohormones and stress substances on the production of harpagoside in devil's claw

Kurzbeschreibung:

Gegenstand dieser Arbeit sind Untersuchungen zur Bildung des Harpagosids in der Teufelskralle bei Einwirkung verschiedener Faktoren (Stress, Hormone, Umwelt, Pilze). Ziel der Untersuchungen ist es, richtungsweisende Aussagen zu geeigneten Einflussfaktoren zu treffen, die eine Steigerung des Harpagosidgehaltes ermöglichen.

Danksagung

Ich möchte mich in erster Linie bei Herrn Dr. Kerns und meiner Betreuerin Frau Dr. König bedanken, die mir die Möglichkeit gaben, meine Bachelorarbeit mit diesem interessanten Thema am SIAB anzufertigen. Des Weiteren bedanke ich mich bei Ihnen für das entgegengebrachte Vertrauen und die tatkräftige Unterstützung in Form von interessanten Ideen.

Ein weiterer Dank gilt meinem Betreuer seitens der Hochschule, Herrn Prof. Dr. Wünschiers, der mir bei aufkommenden Fragen immer Rede und Antwort stand.

Ich bedanke mich außerdem bei der gesamten Belegschaft des SIAB, sowie den Bacheloranden und Masteranden für das angenehme Umfeld und das freundliche Arbeitsklima.

Ein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern der Universität Leipzig. Dabei möchte ich ganz besonders Frau Dr. Fester und Herrn Dr. Rodewald hervorheben, die mir mit Rat, Tat und Chemikalien zur Seite standen. Des Weiteren ermöglichten sie mir die Durchführung der HPLC-Analysen an der Universität.

Einen weiteren Dank möchte ich Herrn Dr. Fester und seiner Technischen Assistentin Frau Häusler vom UFZ in Leipzig dafür aussprechen, dass sie mir Mykorrhizapilze zur Verfügung gestellt und mir die Untersuchung der Wurzeln auf mögliche Mykorrhiza ermöglicht haben.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die mich in der Studienzeit vor allem finanziell und seelisch unterstützt hat. Ohne sie wäre das Studium und somit auch diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
2 Zielstellung	3
3 Theoretische Grundlagen.....	4
3.1 Die Teufelskralle	4
3.2 Mykorrhiza.....	8
3.3 Phytohormone.....	9
3.4 Precursor.....	9
3.5 Elicitoren	10
3.6 Stressfaktoren	10
4 Material	11
4.1 Chemikalien	11
4.2 Medien	11
4.3 (Mikro-)Biologische Reagenzien	12
4.4 Material	12
4.5 Geräte	12
5 Methoden	13
5.1 Probenherstellung	13
5.1.1 Einfluss von Stresssubstanzen	13
5.1.2 Einfluss von Phytohormonen.....	17
5.1.3 Einfluss von Ethylenbegasung	18
5.1.4 Einfluss von unterschiedlichen Lichtverhältnissen	19
5.1.5 Einfluss von Mykorrhizapilzen	20
5.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	23
5.3 Berechnung des Harpagosidgehaltes nach Europ. Arzneibuch	24
6. Ergebnisse	25
6.1 Einfluss von Stresssubstanzen	25
6.1.1 Wachstumsverhalten.....	25

6.1.2 Harpagosidgehalt	26
6.2 Einfluss von Phytohormonen.....	30
6.2.1 Wachstumsverhalten.....	30
6.2.2 Harpagosidgehalt	38
6.3 Einfluss von Ethylenbegasung	41
6.3.1 Wachstumsverhalten.....	41
6.3.2 Harpagosidgehalt	42
6.4 Einfluss von unterschiedlichen Lichtverhältnissen	43
6.4.1 Wachstumsverhalten.....	43
6.4.2 Harpagosidgehalt	44
6.5 Einfluss von Mykorrhizapilzen	45
6.5.1 Wachstumsverhalten.....	45
6.5.2 Harpagosidgehalt	51
7 Ausblick.....	52
8 Zusammenfassung.....	53
9 Summary.....	55
Literaturverzeichnis	VI
Anlagenverzeichnis	VII
Selbstständigkeitserklärung	XXIII

Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.1: Teufelskralle mit Sekundärwurzelknollen.....	4
Abb. 3.2: Hauptwirkstoffe der Teufelskralle.....	5
Abb. 3.3: Syntheseweg von Harpagosid	6
Abb. 3.4: Pilzmyzelien um die Feinwurzeln eines Baumes	8
Abb. 5.1: Stresssubstanzen – Versuchsreihe 1.....	14
Abb. 5.2: Stresssubstanzen – Versuchsreihe 2.....	15
Abb. 5.3: Stresssubstanzen – Versuchsreihe 3.....	16
Abb. 5.4: Erster <i>ex vitro</i> - Versuch	20
Abb. 5.5: Inkubationshaube.....	20
Abb. 5.6: Zweiter <i>ex vitro</i> - Versuch	21
Abb. 6.1: Stresssubstanzen – Versuchsreihe 3 nach 4 Wochen.....	25
Abb. 6.2: Wurzeln mit 100 μ M Abscisinsäure behandelt.....	25
Abb. 6.3: Phytohormonversuch nach 8 Wochen	33
Abb. 6.4: Phytohormonversuch nach 16 Wochen	36
Abb. 6.5: Ethylenversuch 1 nach 4 Wochen	41
Abb. 6.6: Ethylenversuch 2 nach 3 Wochen	41
Abb. 6.7: Lichtversuch bei a) 40 μ E und b) 150 μ E.....	43
Abb. 6.8: Erster <i>ex vitro</i> - Versuch nach 2 Wochen.....	45
Abb. 6.9: Auftretende Kontaminationen	47
Abb. 6.10: Erste sichtbare Wurzeln nach 2 Wochen	47
Abb. 6.11: Zweiter <i>ex vitro</i> - Versuch nach 6 Wochen	48
Abb. 6.12: Zweiter <i>ex vitro</i> - Versuch nach 12 Wochen	49
Abb. 6.13: <i>In vitro</i> - Versuch mit isolierten Pilzsporen	50
Abb. 6.14: Sporen mit Myzelien	50
Abb. A: Chromatogramm Probe R	XVII
Abb. B: Chromatogramm Probe XVIII	XVIII
Abb. C: Chromatogramm Probe XXXVIII	XIX
Abb. D: Chromatogramm Probe EV1 - B	XX
Abb. E: Chromatogramm Probe VL1 - B	XXI
Abb. F: Chromatogramm Probe 3	XXII
Abb. G: Chromatogramm Probe 7.....	XXIII

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Weitere detektierbare Substanzen	5
Tabelle 3.2: Behandlungsmöglichkeiten.....	7
Tabelle 5.1: Versuchsreihen mit Stresssubstanzen	13
Tabelle 5.2: Trockenmassen der Pflanzenteile von <i>H. procumbens</i> nach Inkubation mit Stresssubstanzen	14
Tabelle 5.3: Trockenmassen der Pflanzenteile von <i>H. procumbens</i> nach achtwöchiger Inkubation mit Phytohormonen.....	17
Tabelle 5.4: Trockenmassen der Pflanzenteile von <i>H. procumbens</i> nach sechzehnwöchiger Inkubation mit Phytohormonen	18
Tabelle 5.5: Trockenmassen der Pflanzenteile von <i>H. procumbens</i> nach drei- bzw. vierwöchiger Inkubation mit Ethylengas.....	19
Tabelle 5.6: Trockenmassen der Pflanzenteile von <i>H. procumbens</i> nach fünfwöchiger Inkubation bei einer Lichtintensität von 40 μ E und 150 μ E.....	19
Tabelle 5.7: Trockenmassen der Pflanzenteile von <i>H. procumbens</i> nach zwölfwöchiger <i>ex vitro</i> - Inkubation mit und ohne Mykorrhizapilze	22
Tabelle 5.8: Trockenmassen der Pflanzenteile von <i>H. procumbens</i> nach zwölfwöchiger <i>in vitro</i> - Inkubation mit Mykorrhizapilzsporen	22
Tabelle 6.1: Harpagosidgehalt – Stresssubstanzen	29
Tabelle 6.2: Bewertung des Wachstums von <i>H. procumbens</i> nach 8 Wochen Kultivierung in Phytohormon haltigem Medium	34
Tabelle 6.3: Bewertung des Wachstums von <i>H. procumbens</i> nach 16 Wochen Kultivierung in Phytohormon haltigem Medium	37
Tabelle 6.4: Harpagosidgehalt – Phytohormonversuch nach 8 Wochen.....	40
Tabelle 6.5: Harpagosidgehalt – Phytohormonversuch nach 16 Wochen.....	40
Tabelle 6.6: Harpagosidgehalt – Ethylenversuch	42
Tabelle 6.7: Harpagosidgehalt – unterschiedliche Lichtverhältnisse	44
Tabelle 6.8: Harpagosidgehalt – Mykorrhizapilzversuch	51
 Tabelle A1: Bezeichnung der HPLC- Proben.....	 IX
Tabelle A2: Ergebnisse der HPLC – Analysen.....	XI

Abkürzungsverzeichnis

ABA	Abscisinsäure
BAP	6-Benzylaminopurin
CA	controlled atmosphere – überwachte Atmosphäre
CuSO ₄	Kupfersulfat
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HS	Harpagosid
IAA	Indol-3-Essigsäure
KIN	Kinetin
MC	Microcontainer
MeOH	Methanol
MJ	Methyljasmonat
MP	Mykorrhizapilz
NAA	1-Naphthylessigsäure
NaCl	Natriumchlorid
Ph. Eur.	Europäisches Arzneibuch
SWK	Sekundärwurzelknollen
TM	Trockenmasse
VR	Versuchsreihe

1 Einleitung

In Deutschland gibt es mittlerweile fast 9 Millionen Menschen, die an rheumatischen Erkrankungen leiden (Stand 2009). Dabei ist Rheuma nur ein Überbegriff von Erkrankungen, die den Bewegungsapparat betreffen und zu Schmerzen und einer Bewegungseinschränkung bei den Patienten führen. Es wird überwiegend in vier Gruppen eingeteilt: entzündlich-rheumatische Erkrankungen (zum Beispiel rheumatoide Arthritis, Morbus Bechterew), degenerative Gelenk- und Wirbelsäulenerkrankungen (Arthrosen und Spondylosen), Weichteilrheumatismus und Stoffwechselerkrankungen mit rheumatischen Beschwerden (Osteoporose, Gicht). Die entzündlich-rheumatischen Krankheiten verlaufen chronisch und verursachen Gelenks- und Wirbelsäulenversteifung. Des Weiteren sind die Erkrankungen in der Regel unheilbar. Sollte eine Organbeteiligung vorliegen, kann es lebensbedrohlich werden. Man geht davon aus, dass etwa 2% der erwachsenen Weltbevölkerung von entzündlich-rheumatischen Krankheiten betroffen sind. Besonders rheumatoide Arthritis ist weit verbreitet. Allein in Deutschland sind davon etwa 800.000 Menschen betroffen [Gromnica-Ihle, 2009].

Ebenfalls weit verbreitet sind die degenerativen Gelenk- und Wirbelsäulenerkrankungen. In der Zeit von 1990 bis 2010 soll die Zahl der Erkrankten um 15% auf etwa 5,75 Millionen gestiegen sein. Sie verursachen starke Schmerzen und führen zu einer Einschränkung des Bewegungsapparates. Meist ist eine Fehl- oder Überbelastung der Gelenke schuld an der Gelenksknorpelschädigung [Gromnica-Ihle, 2009].

Aus diesen Gründen müssen neue Mittel und Wege gefunden werden, um den Krankheitsverlauf von rheumatischen Erkrankungen einzudämmen und damit den Patienten ein angenehmeres Leben zu bescheren. Eine Lösung, der immer mehr Beachtung geschenkt wird, ist der Einsatz von Sekundärwurzelknollen (SWK) der Teufelskralle (*Harpagophytum procumbens*) in Form von Tee oder Tabletten. Sie finden schon seit längerem auch in der Volksmedizin ihre Anwendung. Die SWK werden gemahlen und direkt zu Tabletten verpresst, sodass kein Wirkstoff verloren gehen kann. Der Tee wird wiederum aus zerkleinerten Wurzelknollen hergestellt, deren Wirkstoffe über eine

Heißextraktion (Aufguss) herausgelöst werden. Die SWK stammen aus Wildpopulationen der Südstaaten Afrikas. Die klimatisch und geographisch unterschiedlichen Bedingungen lösen jedoch Schwankungen im Wirkstoffgehalt aus, weshalb alle Präparate standardisiert werden müssen.

Jedoch ist die Teufelskralle eine in Namibia und Botswana geschützte [Hachfeld *et al.*, 2000] und auf die Rote Liste der gefährdeten Arten gesetzte Pflanzengattung [Bairu, 2008], woraufhin eine Alternative zu den Wildpopulationen entwickelt werden muss. Die SWK können nur alle drei bis vier Jahre geerntet werden, wodurch immer wieder Versorgungslücken entstehen. Die Teufelskrallen können aufgrund ihrer hohen Keimruhe und des geringen Niederschlages nur sehr schwer auf dem Feld gezüchtet werden. Aus diesem Grund wird versucht, die nötigen Wirkstoffe aus *in vitro* gezüchteten Teufelskrallen zu gewinnen [Hachfeld *et al.*, 2000].

2 Zielstellung

Das Ziel dieser Arbeit ist es, Erkenntnisse zur Korrelation von äußeren Einflussfaktoren auf das Wachstum und die Bildung des Sekundärmetabolites Harpagosid in der Teufelskralle zu gewinnen. Dafür werden verschiedene Substanzen eingesetzt und Veränderungen in der Umgebung vorgenommen, die eine Steigerung des Harpagosidgehaltes hervorrufen könnten. Dazu gehört der Einsatz von stressauslösenden Substanzen, wie Natriumchlorid und Kupfersulfat, Phytohormone, wie Auxine und Cytokinine sowie der Einsatz von Vorläufern des Harpagosids und einer Ethylenbegasung. Für die Simulation der Gegebenheiten in der Wüste werden die Pflanzen unter verschiedenen Lichtverhältnissen kultiviert. Zur Prüfung der Bildung einer Mykorrhiza durch Pilzsporen an den Wurzeln der Teufelskralle und des Einflusses auf die Harpagosidbildung kommen Pilzsporen der Art *Rhizophagus irregularis* für die Versuche zum Einsatz.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Die Teufelskralle

Die Afrikanische Teufelskralle, die zur Familie der Sesamgewächse (*Pedaliaceae*) gehört, ist eine mehrjährige und krautig wachsende Heilpflanze, die nur in den afrikanischen Südstaaten Namibia, Botswana, Südafrika, Zambia, Angola, Zimbabwe und Mosambik wächst. Die Teufelskralle wird in zwei Arten unterteilt, die wiederum in verschiedene Unterarten eingeteilt werden: *Harpagophytum procumbens* DC. und *Harpagophytum zeyheri* Decne. Die Arten sind in unterschiedlichen Gebieten zwischen dem 15. und 30. Breitengrad verbreitet [Kaliampoorthy *et al.*, 2008; Hachfeld *et al.*, 2000] und sind so in Gebieten mit geringem Jahresniederschlag (100- 200 mm/Jahr) heimisch [Hachfeld *et al.*, 2000; Grabowska & Wysokinska, 2009]. Die Teufelskralle bildet kriechende Triebe aus, die jährlich bis zu 2 m lang werden können. Die Triebe sind allerdings sehr empfindlich, sodass sie im Winter bzw. im Sommer aufgrund der extremen Wetterverhältnisse absterben. Nach dem ersten Frühlingsregen werden jedoch neue Triebe gebildet [Bairu, 2008, Jain *et al.*, 2009]. Die Teufelskralle verdankt ihren Namen den holzigen Früchten, die nach der Befruchtung lange verzweigte und mit Widerhaken versehene Arme ausbilden. Des Weiteren bildet die Teufelskralle zur Blütezeit fingerhutähnliche und rotviolette Achselblüten. [Hänsel & Sticher , 2010]. Das Begehrtesten der Teufelskralle sind die 20 - 30 cm langen Sekundärwurzelknollen (Abb. 3.1), die erst nach mehreren Jahren Bestandszeit gebildet werden. Sie enthalten den Großteil der gebildeten Wirkstoffe, die für die Pharmazie von großem Interesse sind. Etwa ein Zehntel der gebildeten Wirkstoffe kann in den gebuchteten Blättern detektiert werden, sodass diese auch als potentielle Wirkstoffquelle angesehen werden können [Hachfeld *et al.*, 2000; Levieille & Wilson, 2002].



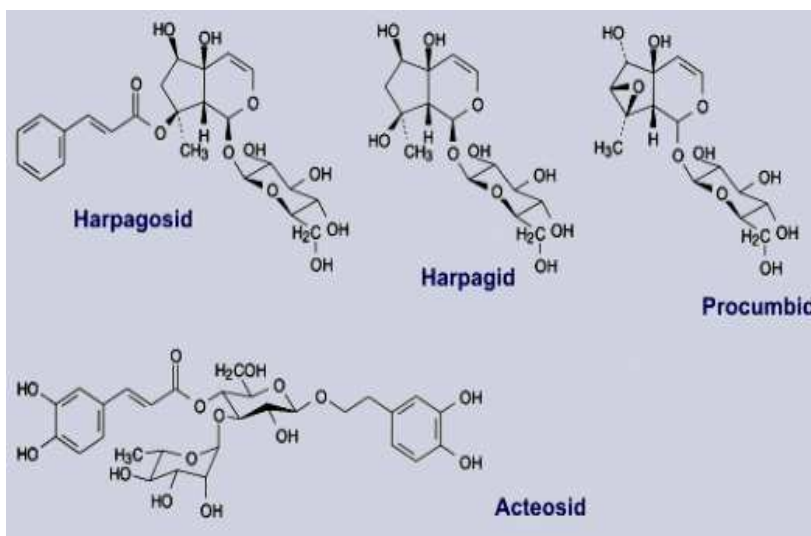
[Georgiev *et al.*, 2013]

Abb. 3.1: Teufelskralle und Sekundärwurzelknollen

Sekundäre Metabolite

Die Teufelskralle produziert Sekundärmetabolite, die in der ganzen Pflanze zu finden sind. Der Großteil dieser Stoffe wird allerdings in den SWK gespeichert. Der Bildungsort dieser Stoffe ist noch nicht geklärt.

Die Wirkstoffe, zu denen die Iridoidglykoside Harpagosid (HS), Harpagid, Procumbid und das Phenolglykosid Acteosid gehören, sind am häufigsten vertreten (Abb. 3.2). Neben den Hauptwirkstoffen sind auch andere Substanzen in geringeren Konzentrationen vorhanden (Tabelle 3.1).



[Wichtl, 2004]

Abb. 3.2 Hauptwirkstoffe der Teufelskralle

Tabelle 3.1: Weitere detektierbare Substanzen

Harpagogenin ^a	8-O-(cis-p-Cumaroyl)-Harpagid ^{c, d}
Leucosceptosid ^b	Procumbosid ^{c, d}
Harpocumbid A & B ^{c, d}	Pagosid ^{c, d}
6-Oa-D-galactopyranosylharpagosid ^{c, d}	Kohlenhydrate, wie Stachyose, Raffinose, Saccharose und Glucose ^d
8-Cinnamoylmyoporosid ^{c, d}	Flavonoide ^d
8-O-Feruloylharpagid ^{c, d}	Kaffee- oder Zimtsäure ^d
6'-O-p-Cumaroylprocumbid ^{c, d}	8-O-p-Cumaroylharpagid ^{c, d}

a [Hachfeld *et al.*, 2000]

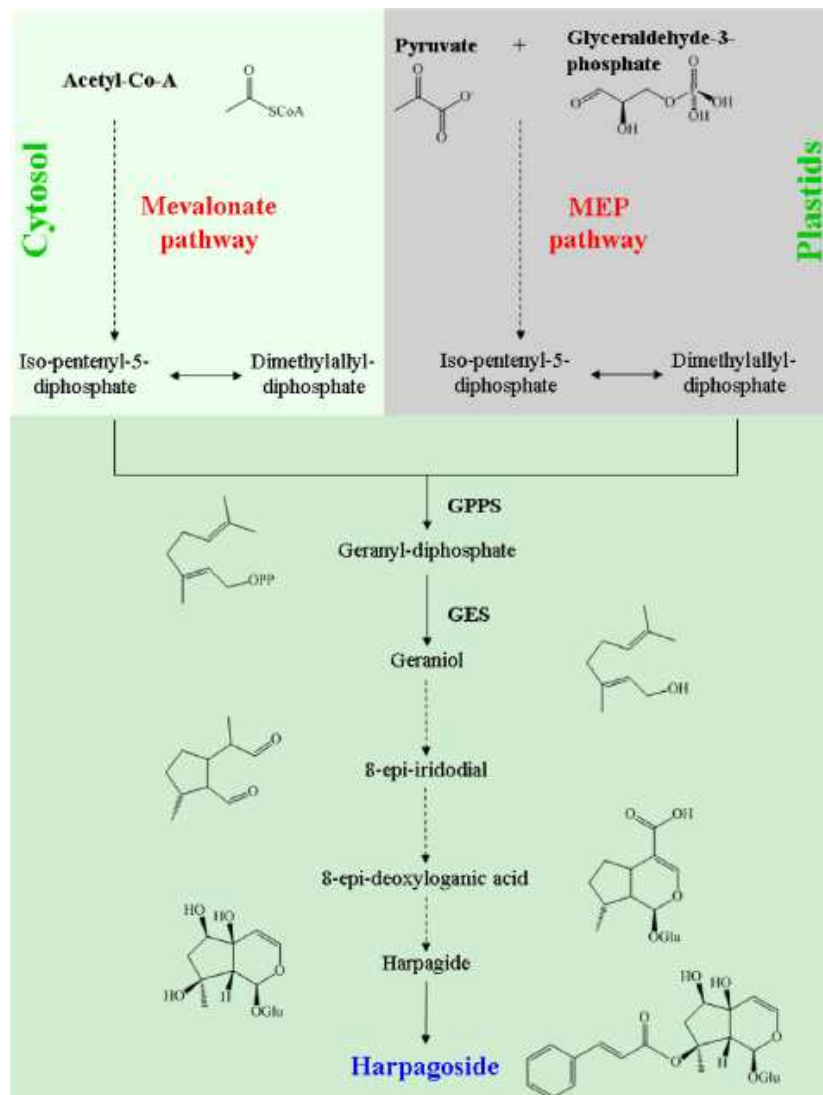
c [Jain *et al.*, 2009]

b [Georgiev *et al.*, 2011]

d [Hänsel & Sticher , 2010]

Syntheseweg von Harpagosid

Harpagosid wird aus zwei verschiedenen Substanzen hergestellt, die aus unterschiedlichen Stoffwechselwegen stammen. Die benötigten Stoffwechselprodukte sind Isopentenyl-5-diphosphat und Dimethylallyldiphosphat und stammen aus dem Mevalonatweg, der im Zytosol der eukaryotischen Zellen stattfindet, bzw. aus dem Methylerythritolphosphatweg, der hauptsächlich in den Plastiden der Pflanzen umgesetzt wird (Abb. 3.3). Aus der Reaktion der beiden Stoffe entsteht unter anderen Geranyldiphosphat, welches zu Geraniol dephosphoryliert wird. In weiteren Zwischenschritten wird Geraniol zu Harpagid und schließlich über das Anhängen der Zimtsäure zu Harpagosid umgewandelt.



[Georgiev *et al.*, 2013]

Abb. 3.3: Syntheseweg von Harpagosid

Medizinische Verwendung

Die Wirkstoffe werden aufgrund ihrer Eigenschaften (analgetisch, antiphlogistisch, entzündungshemmend, antimikrobiell, antiarrhythmisch) für eine Vielzahl von medizinische Zwecken eingesetzt (Tabelle 3.2) [Hachfeld *et al.*, 2000; Grabowska & Wysokinska, 2009; Hänsel & Sticher 2010]. Die Wirkstoffe sind größtenteils gut bis sehr gut verträglich. In seltenen Fällen kommt es zu gastroenterologischen Beschwerden, wie Übelkeit, Blähungen oder Durchfall [Hänsel & Sticher, 2010].

Tabelle 3.2: Behandlungsmöglichkeiten

Arteriosklerose ^a	Magen-Darm-Probleme ^{a, d}
Diabetes ^{a, d}	Hepatitis ^a
Neuralgie ^a	Bluthochdruck ^{a, d}
Lebererkrankungen ^{a, d}	Beschwerden mit der Gallenblase ^a
Nierenerkrankungen ^{a, b}	Arthritis ^b
Osteoarthritis ^b	Herzerkrankungen ^b
Tendinitis ^b	Hexenschuss ^c
Muskelschmerzen ^c	Rheuma ^d
Infektionen der Harnwege ^d	Malaria ^d

a [Hachfeld *et al.*, 2000]

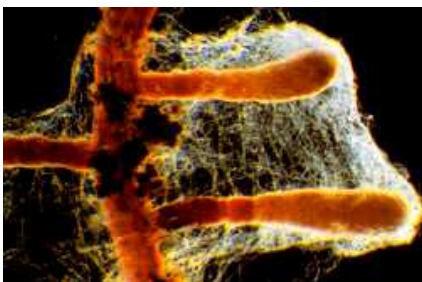
c [Bairu, 2008]

b [Jain *et al.*, 2009]d [Afolayan *et al.*, 2004]

3.2 Mykorrhiza

Der Begriff „Mykorrhiza“ kommt aus dem Griechischen und setzt sich aus den beiden Wörtern *mukês* für Pilz und *rhiza* für Wurzel zusammen. Frei übersetzt bedeutet es in etwa „verpilzte Wurzel“. Die Mykorrhiza bildet eine perfekte Symbiose zwischen dem Pilz und der Pflanzenwurzel. Die Pflanzenwurzel bietet dem Pilz Zucker und dieser revanchiert sich mit dem Transport von verschiedenen Nährstoffen in die Wurzel, die er mit seinem feinen Geflecht aus dem Boden entnommen hat. Die wichtigsten transportierten Nährstoffe sind Phosphor und Stickstoff. Die Pilze besiedeln die Wurzeln und führen zu einer Verpilzung dieser. Das erkennt man an dem feinen Pilzgeflecht, das die Wurzeln umgibt. Viele Mykorrhizapilze sind wirtsspezifisch und können nur an ganz bestimmten Baumarten gefunden werden. Für gewöhnlich leben mehrere verschiedene Arten von Mykorrhizapilzen in den Wurzeln eines Baumes. Die für diese Arbeit interessanten Mykorrhizen sind die ektotrophen Mykorrhizen. Bei der ektotrophen Mykorrhiza werden die Feinwurzeln vom Pilz mit einem dichten Pilzmantel umhüllt und es entsteht ein durchgehendes Pilzgewebe zwischen den Rindenzellen. Die Mykorrhizabildung verursacht ein Ende des Längenwachstums der Feinwurzeln und die Unterdrückung der Ausbildung von Wurzelhaaren, da nun die entstandenen Pilzfäden die Funktion der Nährstoff- und Wasseraufnahme übernehmen. Mykorrhizen leben in der Regel ein bis zwei Vegetationsperioden [Egil & Brunner, 2011].

Der in dieser Arbeit verwendete Mykorrhizapilz ist der Sporen bildende *Rhizophagus irregularis*, der ubiquitär im Boden vorkommt. Er gehört zu einer der vielen Pilze, die eine arbuskuläre Mykorrhiza ausbilden. Diese bilden eine baumartige Hyphenstruktur.



[Egil & Brunner, 2011]

Abb. 3.4: Pilzmyzelien um die Feinwurzeln eines Baumes

3.3 Phytohormone

Phytohormone sind Substanzen, die das Pflanzenwachstum inhibieren oder stimulieren können.

Auxine bestehen aus einer Gruppe von natürlichen und synthetischen Wachstumsregulatoren. Sie werden während der Einleitungsphase der Adventivwurzelbildung und der somatischen Embryogenese benötigt. Sie hemmen das Wachstum neu gebildeter Organe und der Achselknospen und sind für die Kallusbildung erforderlich. Das wichtigste aller natürlichen Auxine ist die Indol-3-Essigsäure (IAA). Zu den synthetischen Auxinen gehört unter anderen die 1-Naphthyllessigsäure (NAA) [Duchefa, 2006].

Cytokinine fördern das Kalluswachstum und die axilläre Verzweigung. Des Weiteren hemmen sie die Wurzelbildung und können in hohen Konzentrationen zu einer unerwünschten Verbuschung der Pflanze führen. Das wohl aktivste in der Pflanzenkultivierung eingesetzte synthetische Cytokinin ist das 6-Benzylaminopurin (BAP). Es führt zu einer Verlängerung des Hypokotyls durch eine vermehrte Zellteilung und -streckung und verzögert die Alterung der Pflanze. Ein weiteres Cytokinin ist das Kinetin (KIN) [Duchefa, 2006].

Abscisinsäure (ABA), ein pflanzliches Stresshormon, wird bei Trocken- oder Wasserstress in der Pflanze angereichert und führt zum Abfallen der Blätter, zur Entwicklung der Knospenruhe und zur Hemmung des Triebwachstums und der Keimung. ABA verursacht außerdem das Schließen der Spaltöffnungen, um eine weitere Transpiration an den Blättern zu verhindern [Duchefa, 2006].

3.4 Precursor

Ist der Syntheseweg eines Sekundärmetaboliten bekannt, bietet sich die Möglichkeit, den Pflanzen Vorläuferverbindungen des Sekundärmetabolites mit dem Nährmedium zur Verfügung zu stellen.

Der Großteil des Harpagosid- Syntheseweges ist bereits bekannt (siehe Punkt 3.1 Teufelskralle, Syntheseweg von Harpagosid). Eine interessante Vorläuferverbindung von Harpagosid ist **Geraniol**, welches sich auch in ätherischen Ölen von Rosen und Geranien befindet. Es wird im Phytoorganismus über mehrere Schritte zu Harpagid und zu Harpagosid umgewandelt [Georgiev, 2013].

3.5 Elicitoren

Elicitoren sind Stoffe, die zur Induktion von bestimmten Sekundärmetaboliten eingesetzt werden. Dabei wird meist ein Angriff von Fressfeinden simuliert, der ganz bestimmte Stoffwechselwege auslöst, um Abwehrsubstanzen zu produzieren, die dem Schutz der Pflanzen dienen sollen. Elicitoren liegen meist zellwandgebunden vor und werden von spezifischen Rezeptoren in der Pflanzenzelle erkannt und gebunden. Die Rezeptoren bewirken die Weiterleitung des Signals in der Zelle (Taraporewala und Culver, 1996; Ji et al., 1998). Ein wichtiger Elicitor ist der Methylester der Jasmonsäure, das **Methyljasmonat** (MJ). Neben der Funktion als Elicitor ist es ein in der Pflanze ubiquitär vorkommendes Phytohormon und führt zu Wachstumsinhibitionen, Seneszenz der Pflanze und zur Anregung der Bildung pflanzlicher Sekundärstoffe [Duchefa, 2006]. Es spielt bei der Abwehrreaktion der Pflanze eine wichtige Rolle. Nach einem pathogenen Angriff erfolgt die vermehrte Produktion von Methyljasmonat, das eine verstärkende Wirkung auf die Produktion von Sekundärmetaboliten hat (Taraporewala und Culver, 1996; Ji et al., 1998).

3.6 Stressfaktoren

Natriumchlorid (NaCl) verursacht in großen Mengen in der Pflanze den Entzug von Wasser aus den Zellen. Da die Salzkristalle zu groß für die Zellporen sind, können sie nicht durch diese diffundieren. Also muss das Wasser aus der Zelle diffundieren, um in der Pflanze einen Konzentrationsausgleich zu erreichen. Das verursacht einen Wasserverlust in der Zelle und führt in großen Mengen zum Absterben der Pflanzen. NaCl soll in den Pflanzen zu einem Trockenstress führen, der die Harpagosidproduktion induziert.

Kupfersulfat (CuSO₄) besteht aus dem Schwermetall Kupfer, welches in der Pflanze toxisch wirkt. Es soll geklärt werden, wie die Teufelskralle in Form der Harpagosidbildung auf diese Stresssubstanz reagiert.

4 Material

4.1 Chemikalien

• Alfa Aesar GmbH & Co KG, (±)-2-cis-4-trans-Abscisinsäure	99%
• Carl Roth GmbH + Co. KG, Essigsäure	2%
• Carl Roth GmbH + Co. KG, Geraniol	≥ 90%
• Carl Roth GmbH + Co. KG, Kaliumhydroxidlösung	10%
• Carl Roth GmbH + Co. KG, Kupfersulfat	10%
• Carl Roth GmbH + Co. KG, Natriumchlorid	99,8%
• Carl Roth GmbH + Co. KG, Referenz Harpagosid	10 mg/ml
• Carl Roth GmbH + Co. KG, Saccharose	≥ 99,5%
• Duchefa Biochemie B.V, 1-Naphthalinessigsäure	> 99%
• Duchefa Biochemie B.V, 6-Benzylaminopurin	> 99,5%
• Duchefa Biochemie B.V, Gamborg B5 Vitamine	112 mg/l
• Duchefa Biochemie B.V, Indol-3-Essigsäure	> 98%
• Duchefa Biochemie B.V, Kinetin	> 98%
• Duchefa Biochemie B.V, Murashige & Skoog Basalt Salt Mixture	4302,09 mg/l
• Duchefa Biochemie B.V, Phytoagar, Gelstärke: 950 – 1050 g/cm ³	
• Sheaffer, Tinte „Sheaffer Skrip Jet Black“	5%
• Sigma Aldrich Co., Methyljasmonat	95%
• VWR, HiPerSolv Chromanorm, Methanol absolute	≥ 99,8%

4.2 Medien

• MS- Medium	1 Liter
○ Murashige & Skoog Basalt Salt Mixture	2,15 g
○ Saccharose	30 g
○ Phytoagar	8 g
○ Gamborg B5 Vitamine	112 mg
○ pH	5,8

- Substratgemisch 1 Liter
 - Weißtorf 600 ml
 - Vermiculite 300 ml
 - Quarz 100 ml

4.3 (Mikro-)Biologische Reagenzien

- *Harpagophytum procumbens*, Afrikanische Teufelskralle, sterile *in vitro*-Pflanzen, Bestand SIAB
- *Rhizophagus irregularis*, in DI- Wasser suspendierte isolierte Sporen und auf Blähtonbasis, zur Verfügung gestellt von Hrn. Dr. Fester, UFZ Leipzig, Department Umweltmikrobiologie

4.4 Material

- Carl Roth GmbH + Co. KG, Quarz, fein, krist., 0,4 – 0,8 mm
- Duchefa Biochemie BV, OS 140 Box + ODS Filter
- Frank Götz Pflanzenzubehör, Vermiculite, grob, 3 – 6 mm
- Frank Götz Pflanzenzubehör, Weißtorf

4.5 Geräte

- Dionex Gina 50 Autosampler
- Dionex P 680 HPLC Pumpe
- Dionex STH 585 Säulen - Ofen
- Dionex UVD 340U Photodiode - Array - Detektor
- Drummond, Elektropipette Portable Pipet Aid XL
- Infors HT, Inkubationsschüttler, Multitron Standard
- Macherey-Nagel, EC 100/4.6 Nucleodur 100-5 C18ec, HPLC - Säule, 100 mm lang, Innendurchmesser: 4,6 mm, Partikelgröße: 5 µm Porengröße: 100 Å
- Nikon, Multifunktionszoom - Mikroskop, AZ100
- Uniequip, Inkubationshaube, Unihood
- Zeiss, Stereomikroskop, Stemi 1000

5 Methoden

5.1 Probenherstellung

5.1.1 Einfluss von Stresssubstanzen

Für die Induktion der Harpagosidbildung durch den Einsatz von Stresssubstanzen wurden 3 Monate alte Pflanzen mit unterschiedlichen Lösungen behandelt. Je zwei der Pflänzchen aus einem Microcontainer (MC) wurden mit einer 20 mM, 30 mM und 40 mM NaCl - Lösung, einer 5 µM, 25 µM und 100 µM MJ - Lösung und einer 100 µM CuSO₄ - Lösung behandelt. Des Weiteren erfolgte eine Behandlung mit einer 140 mM und 280 mM Geraniol - Lösung und einer 5 µM, 25 µM und 100 µM Abscisinsäure - Lösung. Die Lösungen wurden mit einer Einwegspritze durch einen sterilen Vorfilter (0,22 µm) in sterile Zentrifugenröhrchen gespritzt und von da aus wurden je 5 ml der Lösungen mit einer Elektropipette direkt auf das Medium pipettiert, sodass am Ende 15 behandelte Microcontainer à zwei Pflänzchen und drei MC à zwei Pflänzchen als unbehandelte Kontrollen dienten. Die anschließende Kultivierung der Pflänzchen fand bei 26 ± 1°C und einer 16h- Lichtperiode statt. Für die Gehaltsbestimmung an Harpagosid wurden die Pflanzen nach unterschiedlicher Versuchsdauer (Tabelle 5.1) in Wurzeln und Blattwerk getrennt. Die Wurzeln wurden vorsichtig vom Medium befreit und zusammen mit dem Blattwerk über Nacht gefriergetrocknet. Anschließend wurden die Pflanzenteile gemörsert und gewogen. Die Wurzeln und Blätter wurden je nach Trockenmasse mit unterschiedlicher Menge an absolutem Methanol (MeOH) versetzt (Tabelle 5.2) und anschließend für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) vorbereitet.

Tabelle 5.1: Versuchsreihen mit Stresssubstanzen

Versuchsreihe (VR)	Substanzen	Versuchsdauer
1	NaCl (30 mM); CuSO ₄ (100 µM); MJ (100 µM)	1 Woche
2	NaCl (20 mM, 40 mM); Geraniol (140 mM, 280 mM)	2 Wochen
3	MJ (5 mM, 25 mM); ABA (5 mM, 25 mM, 100 mM)	4 Wochen

NaCl – Natriumchlorid; CuSO₄ – Kupfersulfat, MJ – Methyljasmonat, ABA – Abscisinsäure

Tabelle 5.2: Trockenmassen der Pflanzenteile von *H. procumbens* nach Inkubation mit Stresssubstanzen

Zugabe	VR	Konzentration	Trockenmasse Blattwerk [mg]	Trockenmasse Wurzel [mg]	Zugabe MeOH [ml]	
					Blattwerk	Wurzel
Kontrolle	1	---	1543,5	80,0	80,0	20,0
	2	---	261,7	168,7	50,0	50,0
	3	---	558,2	292,5	60,0	40,0
NaCl		20,0	300,7	138,7	50,0	50,0
		30,0	555,0	184,0	80,0	40,0
		40,0	231,8	147,6	50,0	50,0
Methyljasmonat		0,005	343,3	147,1	60,0	30,0
		0,025	261,6	52,1	60,0	30,0
		0,1	606,5	230,0	80,0	40,0
CuSO ₄		0,1	1702,0	113,5	80,0	20,0
Geraniol		0,14	265,3	170,7	50,0	50,0
		0,28	377,5	255,4	50,0	50,0
Abscisinsäure		0,005	238,8	46,4	60,0	30,0
		0,025	321,2	64,6	60,0	30,0
		0,1	295,2	93,6	60,0	30,0

VR – Versuchsreihe; NaCl – Natriumchlorid; CuSO₄ – Kupfersulfat

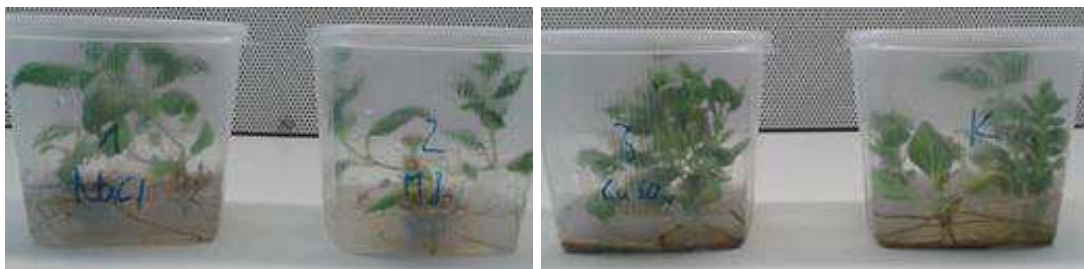


Abb. 5.1: Stresssubstanzen – Versuchsreihe 1; Medium mit NaCl / MJ / CuSO₄ versetzt:
 (1) 30 mM Natriumchlorid (NaCl)
 (2) 100 µM Methyljasmonat (MJ)
 (3) 100 µM Kupfersulfat (CuSO₄)
 (K) Kontrolle

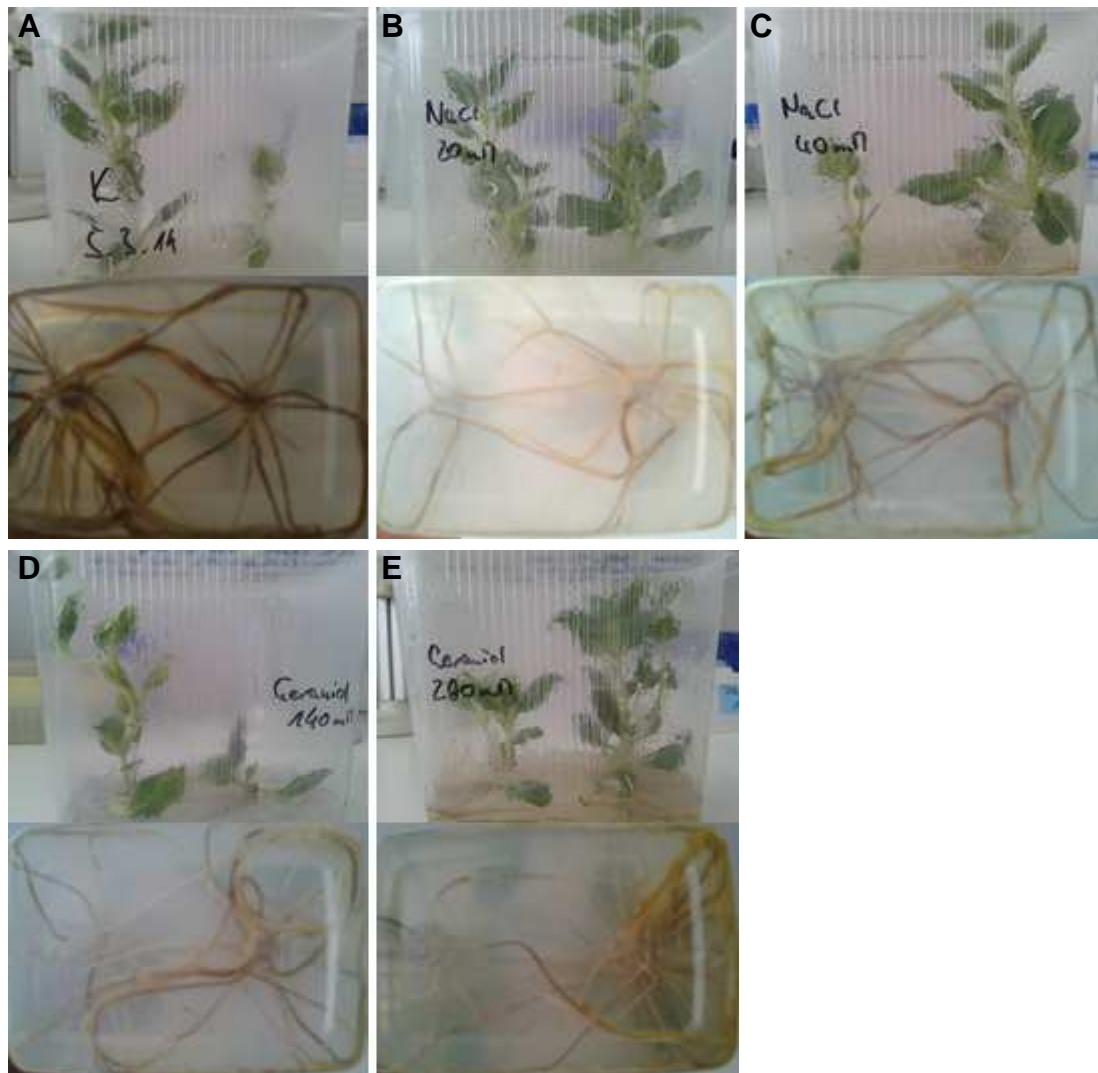


Abb. 5.2: Stresssubstanzen – Versuchsreihe 2; Medium mit NaCl / Geraniol versetzt:
A – Kontrolle, B – 20 mM NaCl,
C – 40 mM NaCl, D – 140 mM Geraniol,
E – 280 mM Geraniol

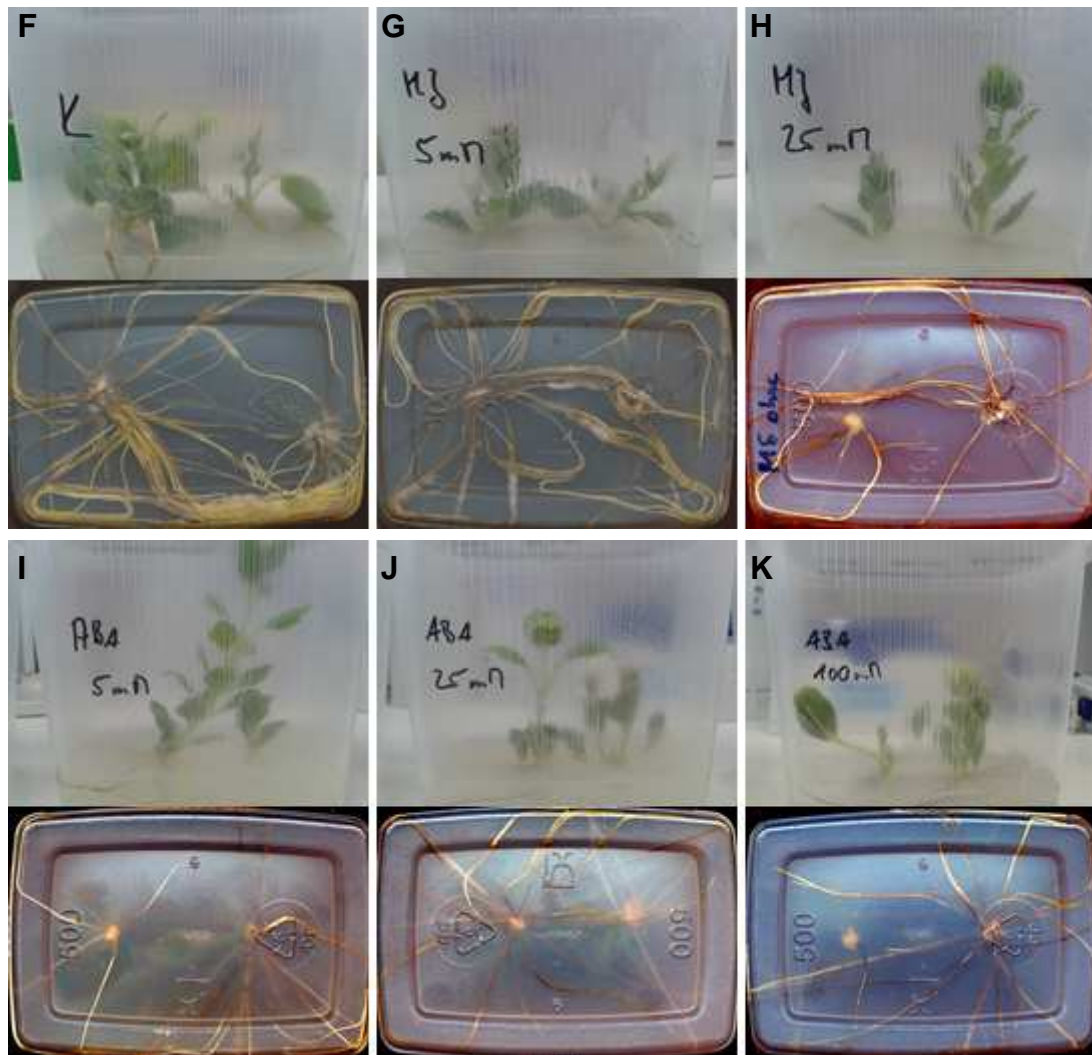


Abb. 5.3: Stresssubstanzen – Versuchsreihe 3; Medium mit MJ / ABA versetzt: F – Kontrolle, G – 5 mM MJ, H – 25 mM MJ, I – 5 mM ABA, J – 25 mM ABA, K – 100 mM ABA

5.1.2 Einfluss von Phytohormonen

Bei den Untersuchungen zum Einfluss der Phytohormone auf das Wachstum und dem Harpagosidgehalt der Teufelskralle wurden anders als in den Stresssubstanzenversuchen frische Stecklinge sofort mit den entsprechenden Hormonen versetzt. Diese wurden aus schon bestehenden *in vitro*-Teufelskrallen gewonnen und in ein MS- Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen an Phytohormonen gesteckt und bei $26 \pm 1^\circ\text{C}$ und einer 16/8h – Photoperiode kultiviert. Um das Wachstum der Stecklinge vergleichen zu können, wurden zusätzlich Kontrollen (Stecklinge in MS - Medium ohne Zusätze) angesetzt. Tabelle 5.3 beinhaltet die unterschiedlichen Konzentrationen der Phytohormone in dem MS - Medium, die eingewogenen Trockenmassen und die verwendete Volumina an MeOH für die Extraktion.

Nach acht Wochen Kultivierungszeit wurde die erste Hälfte der Pflanzen für die HPLC vorbereitet, indem die Wurzeln vom Medium befreit, gefriergetrocknet, gemörsert, gewogen, mit Methanol versetzt und über zwei Tage im Inkubator bei Zimmertemperatur und 110 Umdrehungen pro Minute geschüttelt worden sind. Nach weiteren acht Wochen wurde die zweite Hälfte mittels HPLC analysiert (Tabelle 5.4).

Tabelle 5.3: Trockenmassen der Pflanzenteile von *H. procumbens* nach achtwöchiger Inkubation mit Phytohormonen

Phytohormon	Konzentration	Trockenmasse Blattwerk [mg]	Trockenmasse Wurzel [mg]	Volumina MeOH [ml]	
				Blattwerk	Wurzel
Kontrolle	---	172,9	92,6	20	10
BAP	1 mg/l	180,3	54,9	20	10
	2 mg/l	333,0	126,9	30	15
	3 mg/l	130,4	62,7	20	10
BAP / NAA	0,3 mg/l / 3 mg/l	172,1	655,5	20	60
	1,5 mg/l / 1,5 mg/l	169,7	691,8	20	60
	3 mg/l / 0,3 mg/l	50,2	136,9	10	10
IAA / KIN	0,1 mg/l / 5 mg/l	173,3	182,8	20	20
	2,5 mg/l / 2,5 mg/l	96,6	289,1	10	30
	5 mg/l / 0,1 mg/l	144,2	163,3	15	15

BAP – 6-Benzylaminopurin; IAA – Indol-3-Essigsäure;
KIN – Kinetin; NAA – 1-Naphthylessigsäure

Tabelle 5.4: Trockenmassen der Pflanzenteile von *H. procumbens* nach sechzehnwöchiger Inkubation mit Phytohormonen

Phytohormon	Konzentration	Trockenmasse Blattwerk [mg]	Trockenmasse Wurzel [mg]	Volumina MeOH [ml]	
				Blattwerk	Wurzel
Kontrolle	---	419,4	236,7	40	20
BAP	1 mg/l	437,1	140,3	40	15
	2 mg/l	382,2	280,6	40	30
	3 mg/l	322,9	76,1	30	10
BAP / NAA	0,3 mg/l / 3 mg/l	320,9	723,7	30	70
	1,5 mg/l / 1,5 mg/l	201,3	802,7	20	80
	3 mg/l / 0,3 mg/l	153,8	153,5	15	15
IAA / KIN	0,1 mg/l / 5 mg/l	475,0	379,0	50	40
	2,5 mg/l / 2,5 mg/l	477,2	257,9	50	25
	5 mg/l / 0,1 mg/l	421,2	240,1	40	25

BAP – 6-Benzylaminopurin; IAA – Indol-3-Essigsäure;

KIN – Kinetin; NAA – 1-Naphthyllessigsäure

5.1.3 Einfluss von Ethylenbegasung

Die Ethylenbegasung der Teufelskralle durch Äpfel der Sorte „Gala“ aus DENN's Biomarkt in Leipzig ist als Vorversuch zur Untersuchung des Ethyleneinflusses auf das Wachstum und die Harpagosidbildung zu betrachten. Die Bio- Äpfel wurden unter kontrollierter Atmosphäre (CA) gehalten und nicht mit Methylcyclopropan behandelt, der die Ethylenbildung im Apfel auf chemischen Weg noch lange nach der Behandlung unterdrücken würde. Unter der CA- Bedingung wird der O₂- Gehalt der Luft auf 2- 3 % gesenkt und der CO₂- Gehalt auf 2- 5% angehoben. Die Äpfel verfallen in eine Art Ruhezustand, wodurch die Reifung natürlich reduziert wird.

In der ersten vierwöchigen Versuchsreihe (EV1) wurden zweimal ein MC zu je zwei Pflanzen zusammen mit je einem Apfel in eine abgegrenzte Umgebung gebracht und weiter bei 26 ± 1°C kultiviert. Die Kontrollpflanzen wurden ohne Apfel in einer abgegrenzten Umgebung bei 26 ± 1°C kultiviert. In der zweiten dreiwöchigen Versuchsreihe (EV2) wurden die Teufelskrallen nur zeitweise dem Ethylen ausgesetzt. Die indirekte Begasung erfolgte im täglichen Wechsel mit Ethylen und Luft- CO₂, sodass vier Wochentage der Ethylenbegasung und drei

Tage der Belüftung mit Luft- CO₂ dienten. Die CO₂- Belüftung der Teufelskrallen erfolgte ohne Apfel und von der Umgebung abgeschottet.

Zur Gewährleistung einer ausreichenden Versorgung mit Ethylen bzw. mit CO₂ wurden die MC während des Versuches unverschlossen gehalten. Für die Extraktion wurden die Pflanzenteile gefriergetrocknet, gemörsert und gewogen. Danach erfolgte die Zugabe von MeOH (Tabelle 5.5).

Tabelle 5.5: Trockenmassen der Pflanzenteile von *H. procumbens* nach drei- bzw. vierwöchiger Inkubation mit Ethylengas

VR	Dauer der Ethylenbegasung	Trockenmasse Blattwerk [mg]	Trockenmasse Wurzel [mg]	Volumina MeOH [ml]	
				Blattwerk	Wurzel
1	Kontrolle	385,5	118,1	40	10
2		631,5	269,2	60	25
1	permanent	234,1	143,9	25	15
		225,8	385,1	20	40
2	alternierend	381,6	274,0	40	30
		416,2	146,2	40	15

5.1.4 Einfluss von unterschiedlichen Lichtverhältnissen

Der Einfluss unterschiedlicher Lichtverhältnisse sollte durch die Kultivierung frisch gesteckter Stecklinge in MS - Medium bei einer Lichtintensität von 40 µE und 150 µE eingeschätzt werden. Die Lichtintensität wird in Einstein (E) angegeben und entspricht einem Mol Quanten. Die Raumtemperatur betrug 20°C. Die Pflanzen wurden nach fünf Wochen für die HPLC vorbereitet (Tabelle 5.6).

Tabelle 5.6: Trockenmassen der Pflanzenteile von *H. procumbens* nach fünfwöchiger Inkubation bei einer Lichtintensität von 40 µE und 150 µE

Lichtintensität	Trockenmasse Blattwerk [mg]	Trockenmasse Wurzel [mg]	Volumina MeOH [ml]	
			Blattwerk	Wurzel
40 µE	59,2	45,5	5	5
	111,8	47,7	10	5
150 µE	121,4	35,3	10	5
	187,4	173,2	20	20

5.1.5 Einfluss von Mykorrhizapilzen

Topfversuch unter ex vitro- Bedingungen

Zur Untersuchung der Wirkung von Mykorrhizapilzen (MP) auf die Harpagosidbildung wurden verschiedene Ansätze vorbereitet. Der erste Topfversuch unter ex vitro- Bedingungen bestand in der Kultivierung der Teufelskrallen in Kulturtöpfen mit einem Gesamtvolumen von 600 ml. Das dafür verwendete Substrat bestand aus einer Mischung aus Weißtorf, Vermiculit und Quarz (Verhältnis: 6:3:1). Das Substrat für die Kontrollpflanzen bestand aus 350 ml der oben erwähnten Mischung. Die Versuchstöpfe wurden mit zwei Substratschichten gefüllt, die durch eine Schicht aus Substrat und Sporen des Mykorrhizapilzes *Rhizophagus irregularis* auf Blähtonbasis getrennt waren. Bei diesen Töpfen wurden zuerst 150 ml des reinen Substrats in die Töpfe gefüllt. An diese Schicht schlossen sich 300 ml eines Pilzsporen- Substrat- Gemisches (Verhältnis 2:1) an, die wiederum von 150 ml des reinen Substrates bedeckt wurden. Die Wurzeln der in vitro- Teufelskrallen wurden vor dem Einpflanzen vom Medium befreit. Beim Einsetzen der Teufelskrallen wurde darauf geachtet, dass die Wurzeln ausreichend genug unter dem Pilzsporen- Substrat- Gemisch lagen. Die Töpfe wurden für die Kultivierung in einer Inkubationshaube bei 26°C gehalten und von oben im 16/8h - Rhythmus beleuchtet.

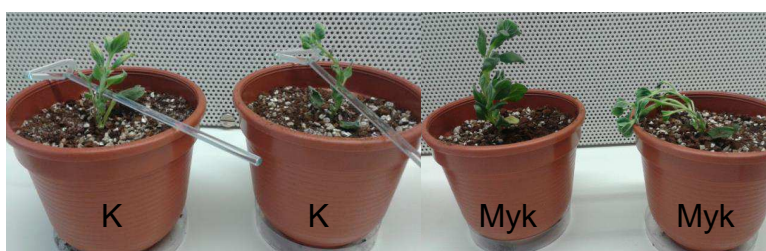


Abb. 5.4: Erster ex vitro- Versuch; K – Kontrolle, Myk – Substrat mit Mykorrhizapilzen



Abb. 5.5: Inkubationshaube

Der zweite *ex vitro*- Versuch erfolgte in verschließbaren Behältern von Duchefa. Das Substratgemisch bestand aus der gleichen Zusammensetzung wie beim ersten Versuch. Die Behälter wurden anders als im ersten Versuch in geschlossenen Containern im Brutschrank bei 26°C inkubiert, um eine hohe Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten.

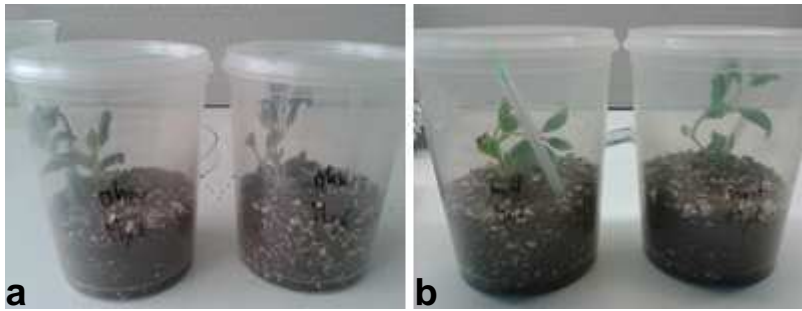


Abb. 5.6: Zweiter *ex vitro*- Versuch; a – Kontrollpflanzen, b – Substrat mit Mykorrhizapilzen

Alle eingepflanzten Teufelskrallen wurden anschließend mit 25 ml sterilem $\frac{1}{2}$ MS - Flüssigmedium erstbewässert. Die Bewässerung der Teufelskrallen wurde alle zwei bis drei Tage mit 10 ml sterilem $\frac{1}{2}$ MS - Flüssigmedium pro Pflanze fortgesetzt. Für die komplette Bewässerung wurden zur Einschränkung des Pilzbefalls statt 15 g Saccharose nur 5 g Saccharose auf einen Liter flüssigem $\frac{1}{2}$ MS - Medium verwendet.

Für den Harpagosidnachweis wurden ausschließlich die Pflanzen aus den geschlossenen Behältern verwendet, da bei den Pflanzen des ersten Topfversuches von einer unzureichenden Verwurzelung ausgegangen werden konnte. Die Pflanzen wurden nach 12 Wochen für die Extraktion vorbereitet. Das entstandene Extrakt wurde zur Bestimmung des Harpagosidgehaltes bei der HPLC verwendet. Die Wurzel einer Teufelskralle des zweiten Topfversuches (Tabelle 5.7, *ex vitro*- Versuch mit MP 2), wurde für den Nachweis der gebildeten Mykorrhiza verwendet und stand der Extraktion somit nicht mehr zur Verfügung.

Tabelle 5.7: Trockenmassen der Pflanzenteile von *H. procumbens* nach zwölfwöchiger *ex vitro*- Inkubation mit und ohne Mykorrhizapilze

Probe	Trockenmasse Blattwerk [mg]	Trockenmasse Wurzel [mg]	Volumina MeOH [ml]	
			Blattwerk	Wurzel
<i>ex vitro</i> - Versuch ohne MP 1	620,3	97,6	60	10
<i>ex vitro</i> - Versuch ohne MP 2	674,4	140,2	70	15
<i>ex vitro</i> - Versuch mit MP 1	556,1	150,6	55	15
<i>ex vitro</i> - Versuch mit MP 2	776,0	167,8 *	80	---

* Wurzel für Färbung verwendet; MP – Mykorrhizapilz

Mykorrhiza auf Festmedium unter sterilen Bedingungen

Für Untersuchungen zum Einfluss von Mykorrhizapilzen auf *in vitro*-Teufelskrallen wurden 100 µl in sterilem DI- Wasser suspendierte *Rhizophagus irregularis* – Sporen auf das Festmedium der *in vitro*- Pflanzen pipettiert. Nach sechs Wochen wurden weitere 100 µl der suspendierten Sporen auf das Medium pipettiert.

Zur Bestimmung der ungefähren Anzahl der pipettierten Pilzsporen wurden die sichtbaren Sporen von 20 µl der Sporensuspension unter einem Mikroskop ausgezählt. Die gezählten Sporen wurden auf 1 ml hochgerechnet.

Die Ansätze wurden nach 12 Wochen auf Mykorrhizabildung mikroskopisch untersucht und zur Bestimmung des Harpagosidgehaltes für die HPLC vorbereitet und analysiert (Tabelle 5.8). Wie auch schon im *ex vitro*- Versuch wurde die Wurzel einer Teufelskralle des Pilzversuches für den Nachweis der gebildeten Mykorrhiza benötigt und war somit für eine anschließende Extraktion nicht mehr verwendbar.

Tabelle 5.8: Trockenmassen der Pflanzenteile von *H. procumbens* nach zwölfwöchiger *in vitro*- Inkubation mit Mykorrhizapilzen

Probe	Trockenmasse Blattwerk [mg]	Trockenmasse Wurzel [mg]	Volumina MeOH [ml]	
			Blattwerk	Wurzel
Kontrolle 1	439,2	218,8	40	20
Kontrolle 2	389,0	188,5	40	20
<i>In vitro</i> - Versuch 1	500,6	114,1	50	10
<i>In vitro</i> - Versuch 2	482,1	153,9 *	50	---

* Verwendung der Wurzel für Färbung

Nachweis der Mykorrhizabildung durch Färbung der Wurzeln nach Vierheilig *et al.* (1998)

Für den Nachweis der Mykorrhizabildung müssen die Wurzeln angefärbt werden. Dazu wurde die Methode nach Vierheilig *et al.* (1998) angewendet.

Die Wurzeln wurden zuerst geerntet und gewaschen. Die anschließende Behandlung der Wurzeln mit 10% Kaliumhydroxidlösung für 10 min. bei 90°C bereitete die Wurzeln auf die Färbung vor. Danach wurden die Wurzeln 2x mit Wasser und 1x mit 2% Essigsäure gewaschen. Es folgte das dreiminütige Anfärben der Wurzeln mit 5% schwarzer Tinte (Sheaffer Skrip Jet Black) in 2% Essigsäure bei 90°C. Zwei- bis dreimaliges Waschen entfernte die überschüssige Tinte von den Wurzeln. In dem Fall einer zu starken Hintergrundfärbung der Wurzeln konnten diese entfärbt werden. Dazu mussten die Wurzeln je 15 min. bei Raumtemperatur in 15, 25, 50 und 70% Ethanol inkubiert werden. Die Entfärbung wurde durch eine Inkubation über Nacht, die in gesättigter Chloralhydratlösung (250 g/ 100 ml in 5% Essigsäure) und bei Raumtemperatur stattfand, abgeschlossen. Die anschließende Betrachtung der Wurzeln unter einem Stereomikroskop brachte die gebildete Mykorrhiza zum Vorschein [Vierheilig *et al.*, 1998].

5.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Extrakte wurden zur Klärung des Harpagosidgehaltes mithilfe der HPLC im Technikum Analytikum der Universität Leipzig analysiert. Die Retentionszeit von Harpagosid lag zwischen 6,73 und 7,45 min. Über die insgesamt 45- minütige Laufzeit der HPLC betrug das Flussmittel 50% Methanol und 50% Wasser. Nach 35 Minuten änderte sich das Verhältnis von MeOH zu Wasser auf 80:20 für fünf Minuten. In den restlichen fünf Minuten wurde das Verhältnis von 50:50 wieder eingenommen. Die Flussrate betrug 1,5 ml/min. Die Säule war eine „EC 100/4,6 Nucleodur 100-5 CC18ec“ von Macherey Nagel. Das Injektionsvolumen betrug 15 µl. Der Detektor maß bei einer Wellenlänge von 278 nm und einer Ofentemperatur von 25°C.

5.3 Berechnung des Harpagosidgehaltes nach Europ. Arzneibuch

$$G = \frac{A_1 * m_2 * F}{A_2 * m_1}$$

G = Gehalt an Harpagosid in %

F = Faktor, abhängig von der Masse

A₁ = Fläche unter Peak von Harpagosid im Chromatogramm der Untersuchungslösung

A₂ = Fläche unter Peak von Harpagosid im Chromatogramm der Referenzlösung

m₁ = Einwaage Droge in der Untersuchungslösung in g

m₂ = Einwaage Droge in der Referenzlösung in g

Die verwendete Formel für die Berechnung des Harpagosidgehaltes wurde dem Europäischen Arzneibuch (Ph. Eur.) [Europäische Arzneibuch - Kommission, 2011] entnommen. Der Faktor, der im Ph. Eur. mit F = 1000 angesetzt war, musste aufgrund der geringeren Massen, die verwendet worden sind, angepasst werden. Es entstand ein Faktor von 60000. Die Berechnung des neuen Faktors befindet sich in Anlage 3. Für die Verwendung des Faktors 60000 bei der Berechnung des Harpagosidgehaltes mussten lt. Ph. Eur. 0,5 g jeder Probe in 100 ml Lösungsmittel gelöst werden. Dabei entstand eine Konzentration von 5 mg/ml. Das heißt, dass sich der Faktor 60000 auf eine Konzentration von c(F) = 5 mg/ml bezog.

6. Ergebnisse

6.1 Einfluss von Stresssubstanzen

6.1.1 Wachstumsverhalten

Die Pflanzen der ersten Versuchsreihe (siehe Tabelle 5.1: Versuchsreihen mit Stresssubstanzen) zeigen keine äußerlichen Veränderungen. Eine Woche ist zu kurz, um Wachstumsveränderungen an den Pflanzen hervorzurufen. Während der zweiwöchigen zweiten Versuchsreihe zeigen die Pflanzen ebenfalls keine sichtbaren Veränderungen im Wachstum. In der dritten Versuchsreihe wiederum führt die Behandlung der Pflanzen mit 5 mM MJ zu trockenen Blattspitzen, abfallenden Blättern und dunklen Wurzeln, die das Medium färbten (Abb. 6.1 – H). Eine Konzentration von 100 mM der Abscisinsäure führt bei den Wurzeln zur Bildung von härteren und helleren Wurzeln (Abb. 6.2).

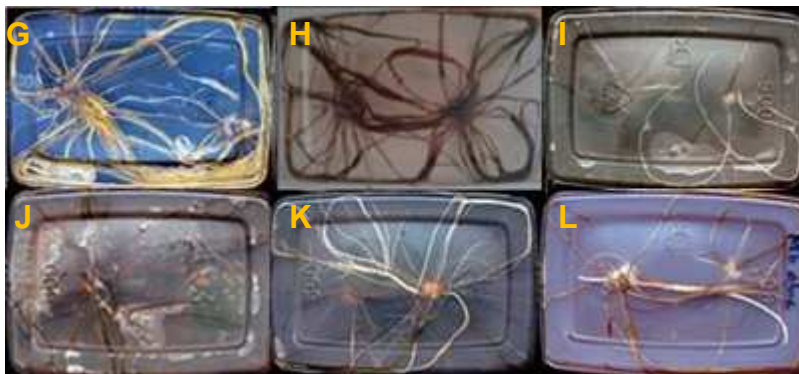


Abb. 6.1: Stresssubstanzen – Versuchsreihe 3 nach vier Wochen;

G – Kontrolle, H – 5 mM MJ, I – 25 mM MJ,
J – 5 mM ABA, K – 25 mM ABA, L – 100 mM ABA



Abb. 6.2.: Wurzeln mit 100 μ M Abscisinsäure behandelt

6.1.2 Harpagosidgehalt

Betrachtet man den Harpagosidgehalt der ersten Versuchsreihe (Tabelle 6.1, VR 1), so fällt auf, dass die Kontrollpflanzen sowohl in den Blättern als auch in den Wurzeln den größten HS- Gehalt aufweisen. Alle anderen Pflanzen der ersten Versuchsreihe produzieren einen geringeren Gehalt an HS, woraufhin anzunehmen ist, dass die verwendeten Zusätze (CuSO_4 , Methyljasmonat, Natriumchlorid) eine hemmende Wirkung auf die Harpagosidbildung haben. CuSO_4 ist ein toxisches Salz und verursacht in der verwendeten Konzentration zwar keine sichtbaren Schädigungen an der Pflanze, dennoch führt es zu einer verringerten Harpagosidkonzentration in den Blättern und Wurzeln. Die größte Hemmwirkung auf die Bildung von Harpagosid hat das Phytohormon Methyljasmonat (MJ). MJ ist ein ubiquitär in Pflanzen vorkommender Inhaltsstoff und kann zu Wachstumsinhibition führen. In dem betrachteten Fall ist in dieser kurzen Einwirkzeit keine Inhibition des Wachstums erkennbar. Nichtsdestotrotz führt die Zufuhr von MJ in der verwendeten Konzentration zur stärksten Reduktion der Harpagosidbildung. Natriumchlorid wirkt in großen Mengen toxisch, da es den Zellen das Wasser entzieht und diese somit vertrocknen. In geringeren Konzentrationen löst es Trockenstressreaktionen aus. Da die Teufelskrallen eine Wüstenpflanze ist, wurde angenommen, dass durch Zugabe von NaCl Trockenstress und damit eine höhere Harpagosidsynthese ausgelöst werden könnte. Die verwendete NaCl-Konzentration führt jedoch gegen diese Erwartungen zur Reduktion des Harpagosidgehaltes.

In den Wurzelproben der zweiten Versuchsreihe (Tabelle 6.1, VR 2) konnte kein Harpagosid festgestellt werden. Stattdessen werden andere unbekannte Substanzen gebildet. Der Grund für die fehlende Detektion von Harpagosid konnte nicht geklärt werden. Möglicherweise ist die verwendete Menge an Methanol zu groß, sodass die Konzentration an Harpagosid zu gering ist, um sie mit der HPLC detektieren zu können. In den Blattproben der zweiten Versuchsreihe können neben Harpagosid andere unbekannte Substanzen festgestellt werden (Anlage 2: Tabelle A2: Ergebnisse der HPLC - Analysen). Der Vergleich der Retentionszeiten der unbekannten Substanzen zeigt auf,

dass es sich bei dem jeweils zweiten Peak der betroffenen Proben, aufgrund der ähnlichen Retentionszeiten, um die gleiche Substanz handeln könnte. Die dritten Peaks der entsprechenden Proben haben ebenfalls eine ähnliche Retentionszeit, wodurch die Substanzen ebenfalls gleich sein könnten. Die ähnlichen Retentionszeiten der Substanzen, die in den Proben I – M (Anlage 2: Tabelle A2: Ergebnisse der HPLC - Analysen) festgestellt werden können, lassen vermuten, dass wieder die gleiche Substanz detektiert wird. Es ist möglich, dass es sich bei den unbekannten Substanzen um eine der in der Teufelskralle schon detektierten Substanzen handeln könnte (siehe Punkt 3.1 Die Teufelskralle; Abb. 3.2 Hauptwirkstoffe der Teufelskralle; Tabelle 3.1: Weitere detektierbare Substanzen). Diese Substanzen müssen aufgrund der hohen Retentionszeit sehr lipophil sein, wodurch es keine Iridoide sein können. Diese sind aufgrund der Glucose nicht lipophil genug. Die Substanz der Probe M, die im ersten Peak detektiert wird, könnte Harpagosid sein. Doch aufgrund der sehr geringen Menge ist es möglich, dass es von der HPLC nicht als solches erkannt wird. Der Vergleich der Proben mit den dazugehörigen Kontrollen zeigt, dass die Verwendung von 20 mM NaCl und 280 mM Geraniol (Tabelle 6.1, VR 2) zu einer Erhöhung des Harpagosidgehaltes in den Blättern führt, wobei 280 mM Geraniol den größten Wert hervorruft. Eine 40 mM NaCl-Lösung hat dagegen keinen Einfluss auf die Harpagosidbildung.

In der dritten Versuchsreihe (Tabelle 6.1; VR 3) ist festzustellen, dass der Gehalt an Harpagosid in den Wurzeln der Kontrolle am kleinsten ist. Der Wirkstoffgehalt in den Blättern der Kontrollpflanze hat jedoch einen mit den Kontrollen aus den anderen Versuchsreihen vergleichbaren Wert. Aus diesem Grund ist eher eine Probenverwechslung denkbar. Eine Behandlung des Mediums mit einer 25 μ M Abscisinsäure-Lösung ruft einen höheren Harpagosidgehalt sowohl bei den Wurzeln als auch bei den Blättern hervor. Die Behandlungen mit ABA und MJ in den verbleibenden Konzentrationen führt zu einer geringeren Harpagosidbildung.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass in dieser Versuchsreihe mit Stresssubstanzen alle analysierten Blattproben (mit einer Ausnahme: Probe MJ, 25 μ M) höhere Harpagosidwerte aufweisen als die aus den Wurzeln der

Teufelskralle gewonnenen Extrakte. Anhand dieser Ergebnisse könnte man darauf schließen, dass dieser Sekundärmetabolit im Blattwerk gebildet wird. Sieht man von der unterschiedlichen Versuchsdauer ab, so verursacht die Behandlung von 20 mM NaCl, 280 mM Geraniol nach zwei Wochen und 25 μ M Abscisinsäure nach vier Wochen Versuchszeit die höchsten Harpagosidgehalte im Vergleich zu ihren Kontrollen.

Tabelle 6.1 (Seite 29) zeigt die in den Wurzeln und Blattwerken erreichten Harpagosidwerte. Des Weiteren werden die HS- Gehalte pro Microcontainer aufgeführt. Alle getesteten Methyljasmonatkonzentrationen hatten einen negativen Einfluss auf die Harpagosidproduktion. Der Einsatz von 20 mM und 40 mM NaCl- Lösung führte nach zwei Woche zu keiner signifikanten Änderung des Harpagosidwertes, wohingegen die 30 mM NaCl- Lösung eine Senkung des HS- Gehaltes bewirkte. Geraniol wirkte sich ab einer Konzentration von 280 mM leicht steigernd auf den Harpagosidgehalt aus. Die Verwendung von 100 μ M Abscisinsäure- Lösung verursachte eine Reduktion des HS- Wertes in den Blättern. ABA in den Konzentrationen 5 μ M und 25 μ M hatte keinen bis leicht steigernden Einfluss auf die HS- Werte.

Tabelle 6.1: Harpagosidgehalt – Stresssubstanzen

VR	Zugabe	Konzentration	Wurzel		Blattwerk	
			Masse HS [mg/g TM]	Ausbeute HS pro MC [mg]	Masse HS [mg/g TM]	Ausbeute HS pro MC [mg]
1	Kontrolle	---	3,02	0,24	4,17	6,44
	NaCl	30 mM	1,11	0,20	1,25	0,69
	CuSO ₄	100 µM	1,50	0,17	3,20	5,45
	MJ	100µM	0,64	0,15	1,07	0,65
2	Kontrolle	---	n.a.	n.a.	3,13	0,82
	NaCl	20 mM	n.a.	n.a.	4,31	1,30
	NaCl	40 mM	n.a.	n.a.	3,12	0,72
	Geraniol	140 mM	n.a.	n.a.	1,86	0,49
	Geraniol	280 mM	n.a.	n.a.	5,32	2,01
3	Kontrolle	---	0,64	0,19	4,39	2,45
	MJ	5 µM	1,02	0,15	1,06	0,36
	MJ	25 µM	1,92	1,00	0,81	0,21
	ABA	5 µM	2,01	0,09	3,31	0,79
	ABA	25 µM	5,05	3,26	4,99	1,60
	ABA	100 µM	2,41	0,23	1,07	0,32

VR – Versuchsreihe, HS – Harpagosid, TM – Trockenmasse, MC – Microcontainer

6.2 Einfluss von Phytohormonen

6.2.1 Wachstumsverhalten

Die Phytohormone verursachen eine ganz unterschiedliche Wirkung auf das Wachstum der Stecklinge. Dabei spielt das Phytohormon selbst und dessen Konzentration eine entscheidende Rolle.

Innerhalb der ersten Woche der Kultivierung beginnt ein Teil der Kontrollpflanzen mit dem Wurzel- und Blattwachstum. Das Wachstum von Wurzeln und Blättern der Versuchspflanzen beginnt erst in der zweiten Woche. Bei BAP (1 mg/l) ist nach zwei Wochen noch keine Veränderung zu verzeichnen. Das Wachstum nach zweiwöchiger Kultivierungsdauer setzt erst bei einer Konzentration von 2 mg/l ein. Hier bilden Dreiviertel der Stecklinge Blätter aus. Wurzeln sind noch nicht sichtbar. Stattdessen bildet sich undifferenziertes Gewebe am Basisende der Stecklinge. Bei einer Konzentration von 3 mg/l BAP im Medium beginnen alle Stecklinge mit dem Blattwachstum, eine Wurzelbildung ist indes noch nicht zu verzeichnen.

Die Zugabe der Kombination aus BAP und NAA verursacht in den ersten zwei Wochen ein Fehlen der Wurzelbildung. Die Bildung von undifferenziertem Gewebe findet jedoch bei allen drei Konzentrationen statt. Die Blattbildung ist bei all den verwendeten Konzentrationen zu beobachten. Das Blattwachstum ist bei einer Konzentration von 1,5 mg/l BAP und 1,5 mg/l NAA am stärksten. Die ersten Wurzeln nach zwei Wochen entstehen bei der Kombination der Phytohormone IAA (5 mg/l) und KIN (0,1mg/l). Diese Kombination führt jedoch nach zwei Wochen zu keiner Blattbildung. Diese findet nur bei den anderen beiden Konzentrationen (IAA - 0,1 mg/l, KIN - 5 mg/l und IAA - 2,5 mg/l, KIN - 2,5 mg/l) statt, wobei je 75% der Stecklinge Blattmasse bilden.

Nach drei Wochen ist nur die Anzahl der blätterbildenden Pflänzchen gestiegen. Wurzeln sind weiterhin nur bei den Phytohormonen IAA (5 mg/l) und KIN (0,1mg/l) vorhanden, wobei sich die Masse und Menge der Wurzeln auch nur unwesentlich vergrößert hat. Blätter bilden sich bei dieser Phytohormonkonzentration jedoch noch keine.

Die Stecklinge, die im Medium mit den Phytohormonen BAP (0,3 mg/l) und NAA (3 mg/l) wachsen, bilden am Basisende ein gelbes Gewebe, welches sich

beginnt, aufzuspalten (Abb. 6.4; Bild IV). Es ist schwer zu sagen, ob es sich dabei um Wurzeln handelt.

Nach vier Wochen bilden alle Pflänzchen der Phytohormone IAA/KIN aller Konzentrationen Wurzeln. Doch die Kombination aus 5 mg/l IAA und 0,1 mg/l KIN bringt bei von den drei getesteten Kombinationen die geringste Blattmasse hervor. BAP (2 mg/l und 3 mg/l) hat bei allen getesteten Stecklingen Blätter gebildet. BAP/NAA zu jeweils 1,5 mg/l bringt ebenfalls bei allen getesteten Stecklingen Blattmasse hervor.

Die Begutachtung der Pflänzchen nach der fünften Woche zeigt, dass ein Viertel der Pflanzen, die 2 mg/l BAP ausgesetzt waren, die ersten Wurzeln bilden. Die Teufelskrallen der Phytohormone BAP (0,3 mg/l) und NAA (3 mg/l) setzten zu diesem Zeitpunkt Schimmel an, sodass sie für die spätere Analyse eingefroren werden mussten und nicht weiter im Medium wachsen konnten. Zu diesem Zeitpunkt sind keine Wurzeln vorhanden. Das undifferenzierte Gewebe ist etwa 1 cm groß und Blätter waren nur bei 50% der betroffenen Stecklinge ausgebildet. Das gelbe sich aufspaltende Gewebe, welches bei der Kombination der Phytohormone BAP (0,3 mg/l) und NAA (3 mg/l) entsteht, ist mittlerweile 3,5 cm groß. Die längsten Wurzeln haben mit 7,5 cm die Kontrollpflanzen.

Das Phytohormon BAP bei einer Konzentration von 3 mg/l kann nach sechs Wochen Kultivierungszeit bei den Teufelskrallen noch keine Wurzelbildung hervorrufen. Die Pflänzchen sind nun bis zu 3,5 cm hoch (BAP/NAA [0,3 mg/l / 3 mg/l]). Die längsten Wurzeln haben nach wie vor die Kontrollpflanzen (11 cm). Die längsten Wurzeln der Nichtkontrollpflanzen haben die Pflanzen der Phytohormonkombination aus IAA (5 mg/l) und KIN (0,1 mg/l) mit knapp 8 cm. Nach acht Wochen Kultivierungszeit wird das Wachstum festgehalten. Die Kontrollen durchzogen ein normales Wurzelwachstum ohne Kallusbildung. 25% der Kontrollpflanzen bilden keine Blätter. Das Wurzelwachstum nimmt mit zunehmender Konzentration an BAP ab (Abb. 6.3, Bild I, II, III). Die Größe des gebildeten Kallus bleibt indes annähernd gleich. Das Blattwachstum bei der Konzentration von 2 mg/l ist dabei am stärksten. Sie führt zu einer Verbuschung der Pflanze. Zum Zeitpunkt der Ernte haben die Pflanzen der Konzentrationen

von 1 mg/l und 2 mg/l die größte Blattmasse aller für diese Versuchsreihe verwendeten Stecklinge.

Beim Vergleich der Bilder IV, V und VI (Abb. 6.3, Seite 33) fällt auf, dass die Kombination aus BAP (0,3 mg/l) und NAA (3 mg/l) die größte Wurzelmasse aller Stecklinge bildet (Bild IV). Die Blattmasse liegt dabei im Mittelfeld. Die geringste Wurzelmasse bildet die Kombination aus 3 mg/l BAP und 0,3 mg/l NAA (Bild VI) (Ernte nach 5 Wochen aufgrund einer Kontamination). Das meiste Kallusgewebe bildet die Kombination aus 1,5 mg/l BAP und 1,5 mg/l NAA (Bild V). Ein weiteres gutes Wurzelwachstum bietet die Kombination aus 0,1 mg/l IAA und 5 mg/l KIN. Das Blattwachstum ist im Vergleich zu den Kontrollpflanzen mittelmäßig. Die anderen Kombinationen bieten schlechtes Blattwachstum und mittelmäßiges Wurzelwachstum mit sehr dünnen Wurzeln. Das komplette Wachstum der Stecklinge in den einzelnen Konzentrationen wurde in Tabelle 6.2 zusammengefasst.

Schluss letztendlich ist zu sagen, dass nach 8 Wochen Kultivierung der Stecklinge in Phytohormon haltigem Medium das Phytohormon BAP in einer Konzentration von 2 mg/l die größte Blattmasse bildet und die meisten Wurzeln von der Kombination aus 0,3 mg/l BAP und 3 mg/l NAA gebildet werden. Generell ist zu sagen, dass alle Stecklinge bis auf die Kontrollen innerhalb der zweiten Woche mehr oder weniger stark ausgeprägtes undifferenziertes Gewebe bilden.



Abb. 6.3: Phytohormonversuch nach 8 Wochen;

a – Kontrollpflanzen, b – Phytohormon ausgesetzte Stecklinge nach 8 Wochen

I- BAP: 1 mg/l, II- BAP: 2 mg/l, III- BAP: 3 mg/l,
 IV- BAP/NAA: 0,3 mg/l / 3 mg/l, V- BAP/NAA: 1,5 mg/l / 1,5 mg/l,
 VI- BAP/NAA: 3 mg/l / 0,3 mg/l (Stand nach 5 Wochen)
 VII- IAA/KIN: 0,1 mg/l / 5 mg/l, VIII- IAA/KIN: 2,5 mg/l / 2,5 mg/l, IX- IAA/KIN: 5 mg/l / 0,1 mg/l

Tabelle 6.2: Bewertung des Wachstumsverhaltens von *H. procumbens* nach 8 Wochen
Kultivierung in Phytohormon haltigem Medium

Phytohormon	Konzentrationen [mg/l]	Kallus- bildung	Blätter	Wurzeln
Kontrolle	---	Nein	< 5 cm	< 15 cm
			50% keine Blattbildung	
BAP	1	Ja	< 5 cm	< 5 cm
			50% keine Blattbildung	
	2	Ja	< 3 cm	< 2,5 cm
	3	Ja	< 2 cm	< 1,5 cm
				50% keine Wurzelbildung
BAP/NAA	0,3 / 3	Ja	< 5 cm	< 3 cm
			50% keine Blattbildung	Gelb bis orange
	1,5 / 1,5	Ja	< 5,5 cm	< 5,5 cm
				50% keine Wurzelbildung
	3 / 0,3	Ja	< 4 cm (nach 5 Wochen)	Keine Wurzelbildung (nach 5 Wochen)
IAA/KIN	0,1 / 5	Ja	< 5 cm	< 7 cm
	2,5 / 2,5	Ja	< 5,5 cm	< 8 cm
				50% keine Wurzelbildung
	5 / 0,1	Ja	< 4 cm	< 9 cm
			50% keine Blattbildung	

BAP – 6-Benzylaminopurin; IAA – Indol-3-Essigsäure;
KIN – Kinetin; NAA – 1-Naphthylessigsäure

Der zweite Teil der Versuchsreihe mit Phytohormonen wurde nach 16 Wochen beendet und analysiert. Nach den 16 Wochen kann bei allen Stecklingen mehr oder weniger ausgeprägtes Wurzel- und Blattwachstum festgestellt werden.

Die Kontrollpflanze bildet nach wie vor die längsten und meisten Wurzeln, wohingegen die Größe der oberirdischen Pflanzenteile von einigen Exemplaren, die den Phytohormonen ausgesetzt waren, übertroffen werden konnte (Tabelle 6.3). Die unteren Blätter der Kontrolle, die im Medium hängen, bekommen braune Spitzen. Die meisten Wurzeln der Nichtkontrollen sind sehr fein, dünn und weniger zahlreich. Es gibt nur sehr wenige Phytohormone, die ein ausreichend gutes Wurzelsystem herbeiführen. Zu diesen gehören BAP (1 mg/l, 2 mg/l) und die Kombination aus IAA und KIN. Mindestens die Hälfte der verwendeten Zusätze bildet ein gutes bis sehr gutes Blattwachstum. Dazu zählen wieder BAP (1 mg/l) und die Kombination von IAA und KIN in den verwendeten Konzentrationen. Ein mittleres bis gutes Blattwachstum bildet die Kombination aus BAP/NAA (0,3 mg/l / 3 mg/l). Die restlichen Phytohormone lösen nur ein mittelmäßiges bis schwaches Blattwachstum aus.



Abb. 6.4: Phytohormonversuch nach 16 Wochen;

a – Kontrollpflanzen, b – Phytohormon ausgesetzte Stecklinge nach 16 Wochen

I- BAP: 1 mg/l, II- BAP: 2 mg/l, III- BAP: 3 mg/l,

IV- BAP/NAA: 0,3 mg/l / 3 mg/l, V- BAP/NAA: 1,5 mg/l / 1,5 mg/l,

VI- BAP/NAA: 3 mg/l / 0,3 mg/l (Stand nach 5 Wochen)

VII- IAA/KIN: 0,1 mg/l / 5 mg/l, VIII- IAA/KIN: 2,5 mg/l / 2,5 mg/l, IX- IAA/KIN: 5 mg/l / 0,1 mg/l

Tabelle 6.3: Bewertung des Wachstumverhaltens von *H. procumbens* nach 16 Wochen
Kultivierung in Phytohormon haltigem Medium

Phytohormon	Konzentrationen [mg/l]	Kallus- bildung	Blätter	Wurzeln
Kontrolle	---	Nein	< 12 cm	< 15 cm
				Sehr zahlreich
BAP	1	Ja	< 14 cm	< 9 cm
				Sehr dünne Wurzeln
	2	Ja	< 6 cm	< 8 cm
			50% keine Blattbildung	Wenige dünne Wurzeln
	3	Ja	< 7 cm	< 6 cm
				Sehr wenige Wurzeln
BAP/NAA	0,3 / 3	Ja	< 13 cm	< 3 cm
				rotbraun
	1,5 / 1,5	Ja	< 4,5 cm	< 3 cm
			Sehr klein geblieben	Wenig, vereinzelt
	3 / 0,3	Ja	< 4 cm (nach 5 Wochen)	Keine Wurzelbildung (nach 5 Wochen)
IAA/KIN	0,1 / 5	Ja	< 10 cm	< 8 cm
			Gutes Blattwachstum	Mittleres bis schlechtes Wachstum
	2,5 / 2,5	Ja	< 9 cm	< 14 cm
			gutes Blattwachstum	Sehr feine Wurzeln
	5 / 0,1	Ja	< 13 cm	< 7 cm
			Sehr gutes Wachstum	Dünne Wurzeln

BAP – 6-Benzylaminopurin; IAA – Indol-3-Essigsäure;
KIN – Kinetin; NAA – 1-Naphthylessigsäure

6.2.2 Harpagosidgehalt

Die Behandlung des Mediums mit Phytohormonen hat nicht nur einen Einfluss auf das Wachstum der Stecklinge, sondern auch auf den Harpagosidgehalt. Die meisten der eingesetzten Konzentrationen senken den Harpagosidgehalt in den Wurzeln nach achtwöchiger Inkubationsdauer (Tabelle 6.4). Bei der Zugabe von 3 mg/l BAP konnten leicht erhöhte Harpagosidkonzentrationen im Vergleich zur Kontrolle erhalten werden. Die Wurzeln, einschließlich des gebildeten Kallusgewebes, haben einen HS- Gehalt von rund 1,65%. Die Kontrollwurzeln weisen dagegen nur einen Gehalt von etwa 1,45% auf (Tabelle 6.4). Mit 0,88% liegt der HS- Gehalt der Blätter dieses Teilversuches jedoch unter dem der Kontrolle (0,93%). Die Kombinationen BAP/NAA (0,3 mg/l / 3 mg/l) und BAP/NAA (1,5 mg/l / 1,5 mg/l) verursachen mit 0,06% bzw. 0,04% den niedrigsten Wirkstoffgehalt. Letzteres senkt auch den Harpagosidgehalt in den Blättern am stärksten (0,47%). Die restlichen Gehalte in den Wurzeln liegen zwischen 0,42% und 1,04%. Die Gehalte in den Blättern liegen zwischen 0,47% (BAP/NAA (1,5 mg/l / 1,5 mg/l)) und 2,02% (IAA/KIN (0,1 mg/l / 5 mg/l)). Die Zusammensetzung aus IAA und KIN führt in den Blättern bei allen verwendeten Konzentrationen zu einem höheren HS- Gehalt als in den Proben der Kontrollpflanzen (Tabelle 6.4).

Aufgrund von immer wiederkehrenden Kontaminationen musste der Teilversuch mit BAP/NAA (3 mg/l / 0,3 mg/l) nach 5 Wochen Versuchsdauer abgebrochen werden. Aus diesem Grund ist dieser gesondert zu betrachten. Erstaunlicherweise weist der wurzellose Kallus nicht den im Vergleich zur Kontrollpflanze kleinsten Gehalt auf (0,42%). Damit kann davon ausgegangen werden, dass Harpagosid nicht nur in den Blättern und Wurzeln, sondern auch im Kallusgewebe gespeichert wird. Der Gehalt in den Blättern ist trotz der geringeren Kultivierungsdauer mit 0,88% nur um etwa 0,05% kleiner als der von der Kontrolle (0,93%), was darauf hinweist, dass auch diese Kombination bei entsprechend gleicher Kultivierungsdauer einen höheren Gehalt im Vergleich zur Kontrolle aufweisen könnte.

Zum Phytohormon nach achtwöchiger Versuchsdauer kann zusammenfassend gesagt werden, dass 3 mg/l BAP zu einer leichten Erhöhung des HS- Gehaltes

in den Wurzeln führen kann. Die Zusammensetzung aus IAA und KIN in den verwendeten Konzentrationen ([0,1 mg/l / 5 mg/l], [(2,5 mg/l / 2,5 mg/l)], [(5 mg/l / 0,1 mg/l)]) erhöht den Harpagosidgehalt in den Blättern. Die anderen Kombinationen führen zu einer Reduktion des Gehaltes sowohl in den Blättern als auch in den Wurzeln.

Beim Vergleich der HS- Werte nach acht Wochen mit denen von 16 Wochen, fällt sofort auf, dass nach 16 Wochen der Gehalt bei allen Teilversuchen gesunken ist. Er ist teilweise auf über ein Viertel bis ein Achtel seines Wertes nach acht Wochen gesunken. Zum Beispiel beträgt der HS- Gehalt in den Blättern nach 8 Wochen beim Versuch mit IAA/KIN bei 0,1 mg/l und 5 mg/l noch über 2%. Nach weiteren 8 Wochen ist er auf 0,45% gesunken. Des Weiteren ist der Gehalt der Kontrollwurzel von 1,45% auf etwa 0,17% gesunken. Insgesamt sind die Werte nach 16 Wochen nur schlecht mit den Werten nach 8 Wochen zu vergleichen. Aufgrund der großen Abweichungen zueinander sind keine Zusammenhänge zwischen den Werten festzustellen.

Die erreichten Werte pro MC in der Wurzel sind nach 16 Wochen im Durchschnitt auf die Hälfte des HS- Wertes nach acht Wochen gesunken. Bei den Blättern ist lediglich ein geringer Abfall der Harpagosidwerte zu verzeichnen. Die HS- Werte in den Blättern sind höher als in den Wurzeln (Ausnahme: IAA/KIN: 2,5 mg/l / 2,5 mg/l; BAP/NAA: 3 mg/l / 0,3 mg/l).

Die höchste HS- Konzentration findet man nach 16 Wochen mit 0,828% in den Wurzeln des Teilversuches mit BAP bei einer Konzentration von 3 mg/l vor. Die Blätter dieses Teilversuches enthalten den höchsten Gehalt von allen untersuchten Blättern. Es wird ein HS- Gehalt von 0,685% gemessen.

Tabelle 6.4: Harpagosidgehalt – Phytohormonversuch nach 8 Wochen

Zugabe	Konzentration	Wurzel		Blattwerk	
		Masse HS [mg/g TM]	Ausbeute HS pro MC [mg]	Masse HS [mg/g TM]	Ausbeute HS pro MC [mg]
Kontrolle	---	14,47	1,34	9,34	1,61
BAP	1 mg/l	7,35	0,40	8,02	1,45
	2 mg/l	8,13	1,03	4,82	1,61
	3 mg/l	16,49	1,03	8,79	1,15
BAP/NAA	0,3 mg/l / 3 mg/l	0,56	0,37	6,78	1,17
	1,5 mg/l / 1,5 mg/l	0,37	0,26	4,71	0,80
	3 mg/l / 0,3 mg/l *	4,15	0,57	8,78	0,44
IAA/KIN	0,1 mg/l / 5 mg/l	8,73	1,60	20,16	3,49
	2,5 mg/l / 2,5 mg/l	5,16	1,49	14,10	1,36
	5 mg/l / 0,1 mg/l	10,37	1,69	18,23	2,63

HS- Harpagosid, TM - Trockenmasse, MC - Microcontainer; * nach 5 Wochen Inkubationsdauer

BAP – 6-Benzylaminopurin; IAA – Indol-3-Essigsäure;

KIN – Kinetin; NAA – 1-Naphthylethylsäure

Tabelle 6.5: Harpagosidgehalt – Phytohormonversuch nach 16 Wochen

Zugabe	Probeninhalt	Wurzel		Blattwerk	
		Masse HS [mg/g TM]	Ausbeute HS pro MC [mg]	Masse HS [mg/g TM]	Ausbeute HS pro MC [mg]
Kontrolle	---	1,70	0,40	2,67	1,12
BAP	1 mg/l	0,42	0,06	2,99	1,31
	2 mg/l	2,18	0,61	2,18	0,83
	3 mg/l	8,28	0,63	6,85	2,21
BAP/NAA	0,3 mg/l / 3 mg/l	0,52	0,38	6,16	1,98
	1,5 mg/l / 1,5 mg/l	0,23	0,18	3,35	0,64
	3 mg/l / 0,3 mg/l *	3,82	0,59	5,11	0,79
IAA/KIN	0,1 mg/l / 5 mg/l	1,26	0,48	4,50	2,14
	2,5 mg/l / 2,5 mg/l	1,64	0,42	3,99	1,90
	5 mg/l / 0,1 mg/l	3,33	1,13	2,95	1,24

HS- Harpagosid, TM - Trockenmasse, MC - Microcontainer; * nach 5 Wochen Inkubationsdauer

BAP – 6-Benzylaminopurin; IAA – Indol-3-Essigsäure;

KIN – Kinetin; NAA – 1-Naphthylethylsäure

6.3 Einfluss von Ethylenbegasung

6.3.1 Wachstumsverhalten

Die vierwöchige dauerhafte Ethylenbegasung der Pflanzen verursacht im ersten Ethylenversuch dunkle, weiche Blätter, die herunterhingen. Der hohe Ethylengehalt in der Umgebungsluft der Teufelskrallen führt zum Ersticken der Pflanzen. Die Kontrollpflanzen sind aufgrund des fehlenden Ethylengases und der für ein normales Wachstum ausreichenden Belüftung unverändert gewachsen. Das Medium ist aufgrund der offenen Behälter verdampft.



Abb. 6.5: Ethylenversuch 1 nach 4 Wochen; a – mit Ethylen begaste Teufelskralle (dauerhaft), b – Kontrollpflanzen

Nach zwei Wochen des zweiten Ethylenversuches sind die Teufelskrallen bereits verändert. Einige Blätter sind weich und dunkelgefärbt. Nach drei Wochen fällt auf, dass nur die unteren und mittleren Blätter braun geworden sind. Die Triebspitzen sind nach wie vor grün. Die Kontrollpflanzen haben ein normales Wachstum vollzogen. Wie auch schon im ersten Ethylenversuch verdampft ein Teil des Medium aufgrund der offen stehenden Behälter.



Abb. 6.6: Ethylenversuch 2 nach 3 Wochen; a – mit Ethylen begaste Teufelskralle (wechselnd), b – Kontrollpflanzen

6.3.2 Harpagosidgehalt

Der Harpagosidgehalt in den Wurzeln und Blättern wird durch die beiden Formen der Ethylenbegasung nicht wesentlich beeinflusst. Bei konstanter Begasung sinkt der HS- Gehalt im Vergleich zur Kontrolle. In den Pflanzen mit alternierender Ethylenbegasung ist ein Trend zu höheren Harpagosidwerten erkennbar (Tabelle 6.6). Alle Blätter produzieren mehr HS als die Wurzeln. Die Ursache liegt allerdings nicht in der Ethylenbegasung, da dieser Fall auch bei den Kontrollen auftritt, die ohne Ethylenbegasung kultiviert worden sind.

Der Einsatz von Ethylen bei der Kultivierung wirkt sich negativ auf das Wachstum und Aussehen der Pflanze aus und bringt keine Erhöhung des Harpagosidgehaltes.

Tabelle 6.6: Harpagosidgehalt – Ethylenversuch

VR	Ethylenbegasung	Wurzel		Blattwerk	
		Masse HS [mg/g TM]	Ausbeute HS pro MC [mg]	Masse HS [mg/g TM]	Ausbeute HS pro MC [mg]
1	Kontrolle	2,61	0,31	4,58	1,77
2		0,52	0,14	3,17	2,00
1	permanent	2,15	0,31	2,84	0,66
		0,40	0,15	3,28	0,74
2	alternierend	1,40	0,38	3,55	1,35
		1,92	0,28	4,39	1,82

VR – Versuchsreihe, HS – Harpagosid, TM – Trockenmasse, MC – Microcontainer

6.4 Einfluss von unterschiedlichen Lichtverhältnissen

6.4.1 Wachstumsverhalten

Die Stecklinge der Teufelskralle, die in einer geringeren Lichtintensität ($40 \mu\text{E}$) kultiviert wurden, haben ein stärkeres Wurzelwachstum als die Pflanzen, die aus einer stärkeren Bestrahlung stammen ($150 \mu\text{E}$). Des Weiteren sind die Pflänzchen bei weniger Licht größer und haben etwas kleinere, eingerollte Blätter. Die Internodien sind größer, wodurch die Pflanzen relativ schmal wirken (Abb. 6.11). Die Pflanzen, die aus dem stärkeren Licht kommen, wirken durch kürzere Internodien gedrungen und haben größere Blätter. Das Wachstum der Wurzeln ist bei höherer Lichtintensität stärker ausgeprägt (Abb. 6.7). Des Weiteren besitzen die Wurzeln eine hellere Farbgebung.

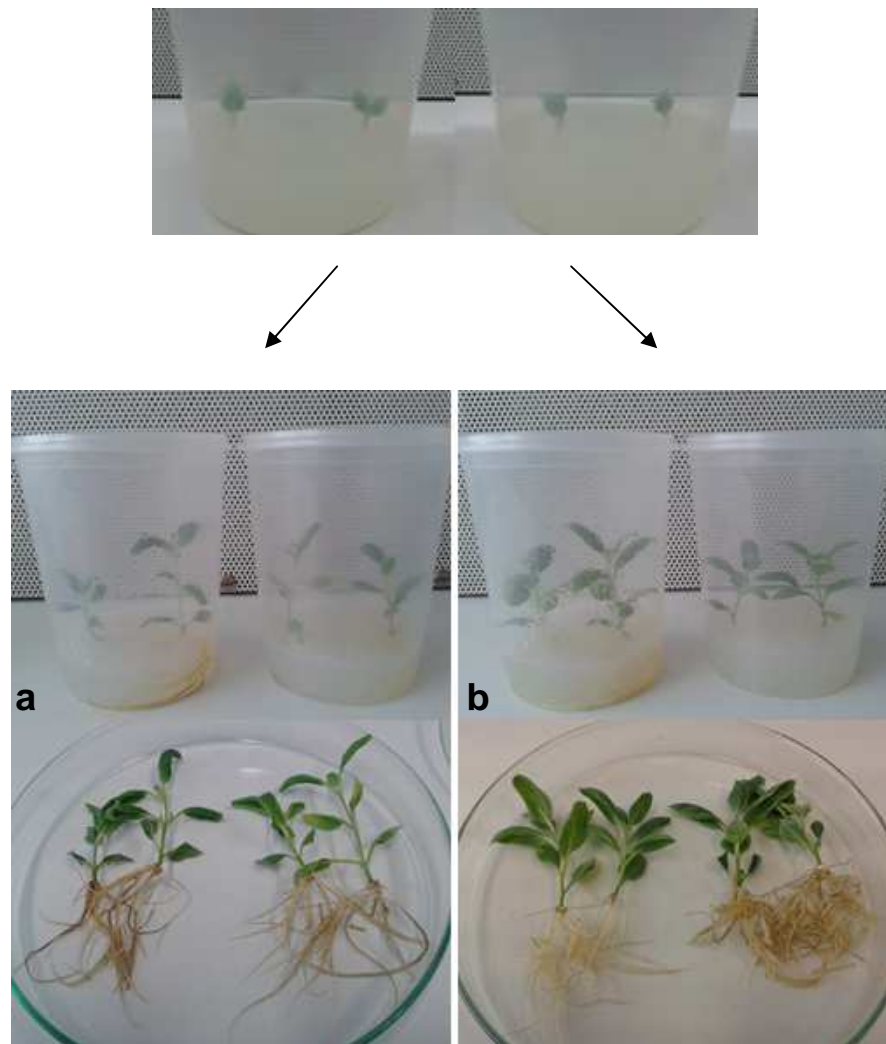


Abb. 6.7: Lichtversuch bei a) $40 \mu\text{E}$ und b) $150 \mu\text{E}$

6.4.2 Harpagosidgehalt

Nach Berechnung des Harpagosidgehaltes aus den Werten der HPLC- Analyse wird deutlich, dass die Kultivierung der Teufelskrallen bei einer Lichtintensität von 150 μE im Durchschnitt eine senkende Wirkung auf den Harpagosidgehalt in den Wurzeln hat. Dafür wächst der Harpagosidgehalt in den Blättern der Teufelskrallen aus der stärkeren Lichtintensität im Durchschnitt um mehr als das Anderthalbfache an. Der geringe HS- Gehalt in der Pflanze ist möglicherweise auf die geringere Kultivierungstemperatur zurückzuführen. Teufelskrallen sind Wüstenpflanzen, die hohen Temperaturen ausgesetzt sind und darauf ihre Harpagosidbildung ausgerichtet haben. Bei Verringerung der Kultivierungstemperatur wird die Harpagosidproduktion aufgrund der wechselnden Umgebungsbedingung gedrosselt.

Die pro Microcontainer erreichten HS- Werte der Wurzeln liegen im einstelligen Mikrogrammbereich, wohingegen in den Blättern weitaus mehr Harpagosid detektiert werden kann. Es wird in den Blättern eine mehr als 30- fache Menge an Harpagosid detektiert als in den Wurzeln.

Tabelle 6.7: Harpagosidgehalt – unterschiedliche Lichtverhältnisse

VR	Lichtintensität	Wurzel		Blattwerk	
		Masse HS [mg/g TM]	Ausbeute HS pro MC [mg]	Masse HS [mg/g TM]	Ausbeute HS pro MC [mg]
1	40 μE	0,14	0,00637	1,91	0,11
2		0,12	0,00572	1,47	0,16
3	150 μE	0,12	0,00424	2,23	0,27
4		0,04	0,00693	0,94	0,18

VR – Versuchsreihe, HS – Harpagosid, TM – Trockenmasse, MC – Microcontainer

6.5 Einfluss von Mykorrhizapilzen

6.5.1 Wachstumsverhalten

Topfversuch unter ex vitro- Bedingungen

Der erste *ex vitro*- Versuch bestand in der Kultivierung von 3 Monate alten Teufelskrallen in Pflanzgefäßen aus lichtundurchlässigem Polypropylen. Dabei waren in zwei von vier Übertöpfen Sporen des Mykorrhizapilzes *Rhizophagus irregularis* Bestandteil des Substrats. Die eingetopften Pflanzen standen in einer Inkubationskammer, die die Temperatur durch die Zufuhr von warmer Luft regulierte. Da die Pflanzen gegen den warmen Luftzug mehr oder weniger ungeschützt waren, vertrocknen diese trotz regelmäßigem Gießen nach zwei Wochen (Abb. 6.8).

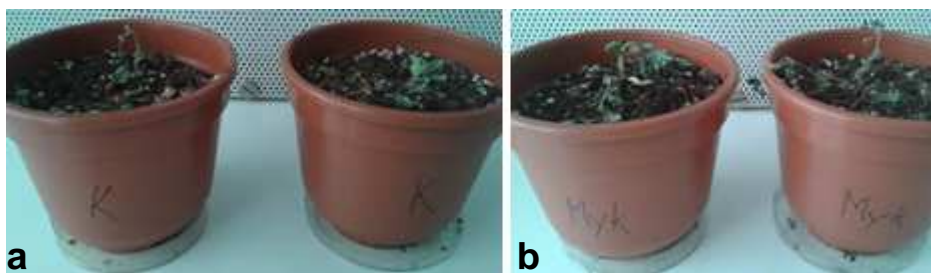


Abb. 6.8: Erster *ex vitro*- Versuch nach 2 Wochen; a – Kontrollpflanzen,
b – Substrat mit Mykorrhizapilzen versetzt

Der zweite *ex vitro*- Versuch erfolgte in abgeschlossenen Behältern, die für eine hohe Luftfeuchtigkeit sicherstellten. Des Weiteren sorgte die Kultivierung der eingetopften Teufelskrallen im Brutschrank in Hinblick auf die Beleuchtung und die Temperatur für eine gewohnte Umgebung. Trotz einiger Kontaminationen des Substrates, welches in solch einem Fall, wenn möglich, oberflächlich ausgetauscht worden ist, und der Pflanzen, dessen befallene Blätter bei einer Kontamination entfernt werden müssen, war eine gute Entwicklung der Pflanzen zu beobachten. Mögliche Kontaminationen waren Pilze auf Blättern oder Stängeln, der oberflächliche Befall des Substrates von grauen Pilzkolonien oder grünlich - blaue Kolonien, die das Substrat durchzogen (Abb. 6.9). Letzteres hätte nur durch den kompletten Tausch des Substrates entfernt werden können. Die restlichen Kontaminationen konnten erfolgreich durch die

Entfernung der befallenen Stellen beseitigt werden. Des Weiteren entstand durch eine einseitige Beleuchtung und zu viel Flüssigmedium im Substrat Moos am Inneren der Behälterwand, der für das weitere Wachstum der Pflanzen keine Rolle spielte.

Eine Pflanze, die in Mykorrhiza versetztem Substrat wuchs, hatte sich von den Kontaminationen nicht erholen können und wuchs nun nur noch vergleichsweise langsam. Der Stängel war an einer Stelle weich geworden, wodurch der obere Teil der Pflanze abknickte. Allerdings trieben die Knoten unterhalb der befallenen Stelle. Diese Pflanze bildete keine von außen sichtbare Wurzeln (Abb. 6.11 – C – links). Die anderen Pflanzen hatten ein gutes Wurzel- und Blattwachstum (Abb. 6.11 – A; Abb. 6.11 – C – rechts). Die Kontrollpflanzen (ohne MP) bildeten nach etwa zwei Wochen Kultivierungszeit von außen sichtbare Wurzeln (Abb. 6.10). Nach spätestens sechs Wochen war bei drei der vier Pflanzen ein Wurzelwachstum an der Innenseite der Behälterwand zu verzeichnen (Abb. 6.11 – B, D). Einzig und allein die Pflanze (mit MP) (Abb. 6.9 – links), die vom Pilz befallen war, bildete keine sichtbaren Wurzeln. Bei der Entnahme der Pflanze wurde festgestellt, dass sich kaum zusätzliche Wurzeln gebildet hatten. Des Weiteren war das Blattwachstum sehr schwach ausgeprägt. Die getriebenen Knoten waren etwa 1 cm groß. Das Blattwachstum der restlichen drei Behälterpflanzen nach 12 Wochen war sehr gut (Abb. 6.12 – A, C). Die Teufelskrallen waren um mehr als das Doppelte ihrer anfänglichen Pflanzengröße gewachsen. Einige Pflanzen hatten durch Kontaminationen Blätter verloren. Die neu gebildeten Wurzeln dieser Teufelskrallen waren sehr dünn und gebrechlich (Abb. 6.12 – B, C), sodass es schwierig war, die Wurzeln im Ganzen zu ernten. Außerdem war es aufgrund der durch das Substrat entstandenen dunklen Färbung der Wurzeln schwierig, diese von dem im Substrat vorhandenen Torffasern zu unterscheiden. So ging einiges an Wurzelmaterial verloren, das für eine genauere Bestimmung des Harpagosidgehaltes wichtig gewesen wäre.

Die Färbung der Wurzeln nach Vierheilig *et al.* (1998) brachte bei den Wurzeln der in Substrat gesetzten Pflanzen keinen Erfolg. Es waren weder Myzelien noch Arbuskeln (baumartige Verzweigung des Pilzgeflechts) zu erkennen. Eine Existenz von Myzelien an den Wurzeln ist dennoch möglich, da das Substrat durch das Verunreinigen der Wurzeln eine optimale Färbung verhindert.



Abb. 6.9: Auftretende Kontaminationen



Abb. 6.10: Erste sichtbare Wurzeln nach 2 Wochen; Versuch ohne Mykorrhizapilze

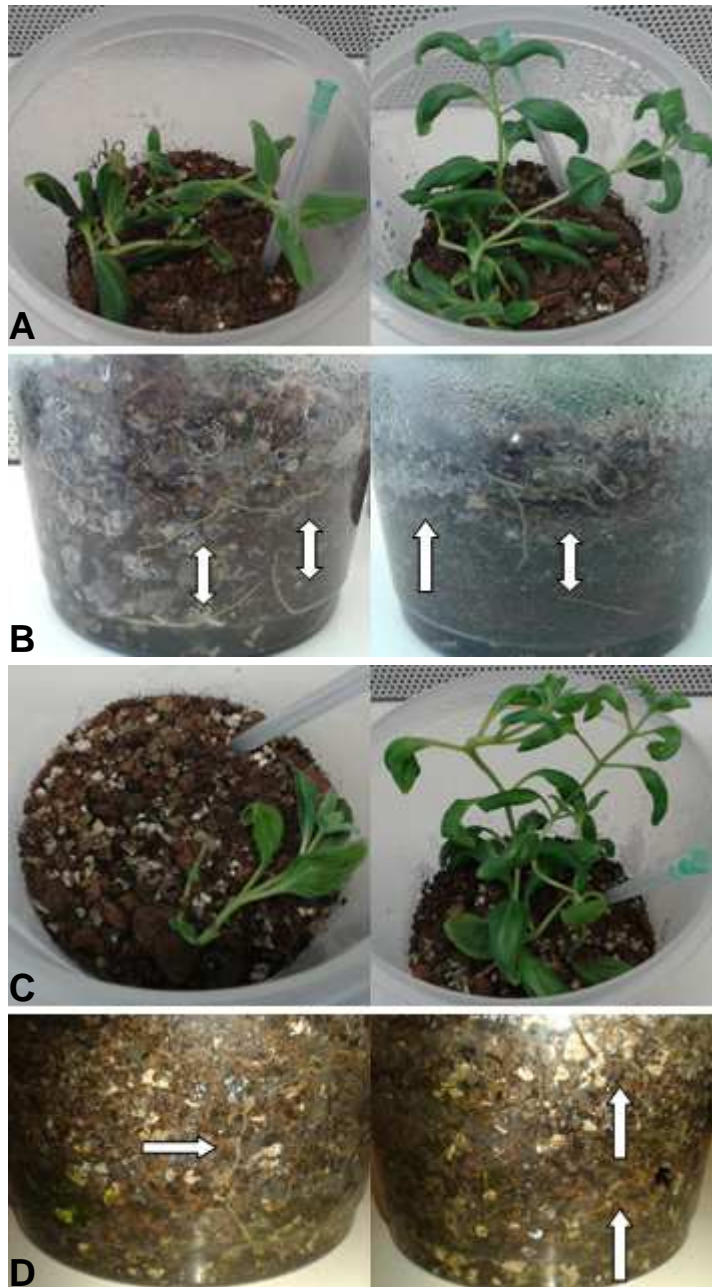


Abb. 6.11: Zweiter *ex vitro*- Versuch nach 6 Wochen;

- A – Kontrollpflanzen, Aufsicht
- B – Kontrollpflanzen, Wurzelansicht
- C – Substrat mit Mykorrhizapilzen, Aufsicht
- D – Substrat mit Mykorrhizapilzen, Wurzelansicht

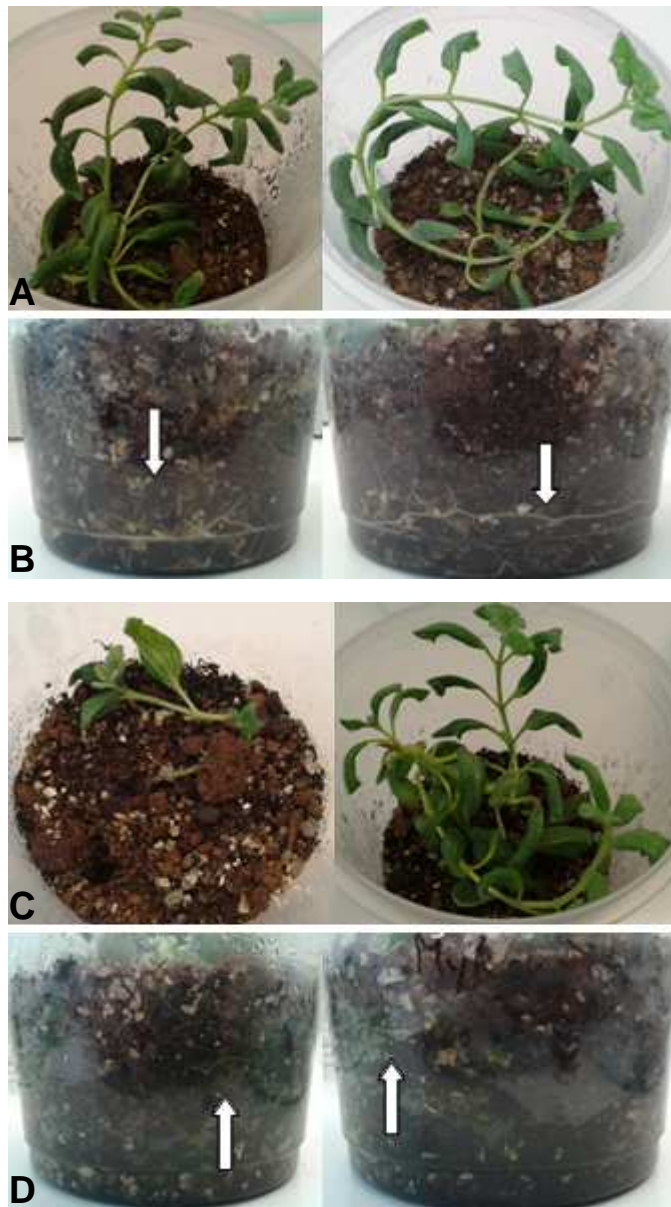


Abb. 6.12: Zweiter *ex vitro*- Versuch nach 12 Wochen;

- A – Kontrollpflanzen, Aufsicht
- B – Kontrollpflanzen, Wurzelansicht
- C – Substrat mit Mykorrhizapilzen, Aufsicht
- D – Substrat mit Mykorrhizapilzen, Wurzelansicht

Mykorrhizapilze auf Festmedium

Als dritter Versuch mit Mykorrhizapilzen wurde das Medium *in vitro* kultivierter Teufelskrallen mit *Rhizophagus* - Sporen versetzt. Es wurde eine Anzahl von 4500 Sporen pro Milliliter errechnet. Das bedeutet, dass bei dem Versuch 2x 450 Sporen auf das Medium pipettiert worden sind.

Im Wachstum der Versuchspflanzen ist kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollpflanzen zu erkennen (Abb. 6.13), sodass davon ausgegangen werden kann, dass keine oder nur sehr wenig Mykorrhiza gebildet wurde.

Die Wurzeln weisen nach der Färbung nach Vierheilig *et al.* (1998) eine äußere Mykorrhizierung auf. Das heißt, die Pilzsporen haben Myzelien gebildet, die noch nicht in die Wurzeln vorgedrungen sind (Abb. 6.14). Eine Kolonisierung der Pilzmyzelien in den Wurzeln lässt sich hingegen nicht eindeutig feststellen und nur in Ansätzen erahnen. Die nicht eindeutig festzustellende Mykorrhizierung ist der Grund, warum keine Wachstumsunterschiede im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen sind. Die angesetzte Kultivierungszeit reicht nicht aus, um eine angemessene Mykorrhizierung zu erreichen. Es können keine Arbuskeln festgestellt werden.

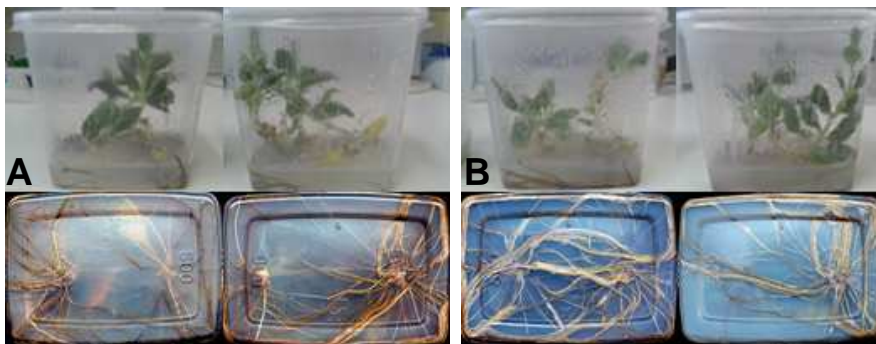


Abb. 6.13: *In vitro*- Versuch mit isolierten Pilzsporen;
A – Kontrollpflanzen, B – Medium mit isolierten Sporen von *Rhizophagus irregularis*

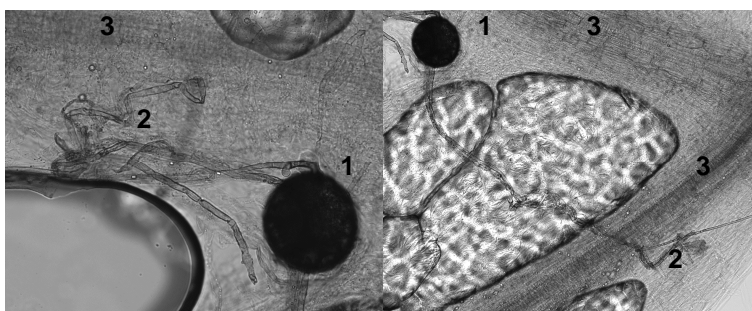


Abb. 6.14: Sporen mit Myzelien; 1 – Pilzspore, 2 – Myzelien, 3 – Zentralzylinder der Wurzel

6.5.2 Harpagosidgehalt

Das Einpflanzen der Teufelskrallen in das Substratgemisch im zweiten *ex vitro*-Versuch (VR 2) verursacht im Durchschnitt in den Wurzeln eine höhere Harpagosidproduktion als in den Blättern. Grund dafür kann sein, dass sich die Pflanzen durch den Einsatz des Substrates näher an ihren natürlichen Umgebungsbedingungen befinden als im Medium. Diese Versuchsreihe ist die einzige, in der die Wurzeln in einem Substrat ohne Lichteinwirkung untergebracht waren. Die gemessenen HS- Gehalte der Wurzeln erreichten sowohl bei den Kontrollpflanzen als auch in den mit MP behandelten Gefäßen die höchsten Werte. Die MP im Substrat führen zu einer Senkung des HS-Gehaltes in den Blättern.

Die Blätter der Kontrollpflanzen aus dem Sterilversuch (VR 3) bilden mehr HS als die Wurzeln. Wird das Medium mit Sporen des MP versetzt, so wird im Gesamten mehr HS gebildet. Die Wurzeln bilden nun mehr HS als die Blätter. Entweder führt der MP dazu, dass das Harpagosid aus den Blättern in den Wurzeln gespeichert wird oder dass die Wurzeln durch den Pilz von Anfang an mehr HS als die Blätter produzieren.

Tendenziell ist zu erkennen, dass die Anwesenheit der MP im Substratgemisch zu höheren HS- Gehalten in der Wurzel führt. Dieser Trend ist ebenso bei den steril geführten Versuchen (VR3) zu erkennen

Tabelle 6.8: Harpagosidgehalt – Mykorrhizapilz- Versuch

VR	Probeninhalt	Wurzel		Blattwerk	
		Masse HS [mg/g TM]	Ausbeute pro MC [mg]	Masse HS [mg/g TM]	Ausbeute pro MC [mg]
2	Kontrolle in Substrat	13,42	1,31	5,53	3,43
	Kontrolle in Substrat	1,15	0,16	3,54	2,40
	Substrat mit MP	24,60	3,70	2,19	1,70
	Substrat mit MP	*	---	2,87	1,60
3	Kontrolle in Medium	1,89	0,41	4,39	1,93
	Kontrolle in Medium	2,32	0,44	6,73	2,62
	Medium mit MP	5,60	0,64	4,07	2,04
	Medium mit MP	*	---	3,39	1,63

VR – Versuchsreihe, HS – Harpagosid, TM – Trockenmasse, MC – Microcontainer, MP – Mykorrhizapilz; * Wurzel für Färbung verwendet

7 Ausblick

Die im Rahmen der Arbeit erhaltenen Ergebnisse belegen, dass die untersuchten chemischen, biologischen und physikalischen Einflussfaktoren das Wachstumsverhalten sowie die Bildung des Sekundärmetaboliten Harpagosid beeinflussen. Für weiterführende Arbeiten wäre eine tiefergehende Analyse der Wirkung der Abscisinsäure, der Phytohormonkombination IAA/KIN und der Mykorrhizapilze angebracht.

Des Weiteren liegt die Zukunft in der Ermittlung anderer auf die Harpagosidbildung positiv wirkenden Stoffe. Außerdem ist eine Anpassung der Pflanzen an die natürlichen Umweltbedingungen im Süden Afrikas möglich, indem eine Simulation des Wechsels zwischen Sommer- und Winterzeit und zwischen Tag und Nacht erfolgt. Dazu kann der Beleuchtungsrhythmus und die Tag- bzw. Nachttemperatur an die natürliche Umgebung der Pflanzen angepasst werden. Eine Abdunkelung der Wurzeln während der Kultivierung simuliert ein Wachstum im natürlichen Boden. Eine Erzeugung von Trockenstress könnte ebenfalls zu einer erhöhten Harpagosidbildung führen. Die Kultivierung der Teufelskralle unter der Verwendung von UV – Licht führt möglicherweise durch den Stress, dem die Pflanzen ausgesetzt sind, zu einem höheren Harpagosidgehalt. Da 12 Wochen für eine ausreichende Mykorrhizierung der Wurzeln sowohl der *in vitro*- als auch der *ex vitro*- Pflanzen nicht ausreichend sind, ist zu empfehlen, diesen Versuch länger bestehen zu lassen, sodass sich genügend Myzelien bilden können, die dann sowohl das Wachstum als auch den Harpagosidgehalt erhöhen. Alle Versuche sollten außerdem in einem größeren Umfang durchgeführt werden, um eine statistische Sicherheit zu gewährleisten.

8 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit betrifft Untersuchungen zum Verhalten von *in vitro* kultivierten Teufelskrallenpflanzen auf Stresssubstanzen, Phytohormone, unterschiedliche Lichtverhältnisse und Mykorrhizapilze. Ziel war es, Erkenntnisse hinsichtlich möglicher Einflussfaktoren zur Steigerung des Gehaltes des Sekundärmetaboliten Harpagosid zu gewinnen.

Alle HS- Gehalte der Kontrollpflanzen weisen untereinander zum Teil starke Schwankungen auf, weshalb eine geringe Steigerung der Harpagosidwerte in den Versuchen nur wenig aussagekräftig ist. Die HS- Werte der Versuchspflanzen sollten die Werte der Kontrollpflanzen um ein Vielfaches übersteigen, um eine signifikante Aussage treffen zu können.

In einigen Versuchen konnte der Harpagosidwert erhöht werden. Der Einsatz von 280 mM Geraniol und 25 μ M Abscisinsäure führte zu einer deutlichen Erhöhung der Harpagosidgehalte in den Wurzeln und Blättern im Vergleich zu den Kontrollpflanzen. Die verbleibenden Stresssubstanzen führten entweder zu keiner deutlichen Gehaltveränderung oder zur Senkung der Harpagosidgehalte. Die HS- Werte der Teufelskrallen, die acht Wochen in Phytohormon- haltigem Medium inkubierten, waren zum Großteil kleiner als die Gehalte in den Kontrollpflanzen. Der Einsatz von 3 mg/l BAP führte jedoch zu einem höheren HS- Gehalt in den Wurzeln. Mit der Verwendung der Kombination aus IAA und KIN in den verwendeten Konzentrationen ([0,1 mg/l / 5 mg/l], [(2,5 mg/l / 2,5 mg/l)], [(5 mg/l / 0,1 mg/l)]) konnte eine Erhöhung des Harpagosidgehaltes in den Blättern erreicht werden. Das Wachstum der Wurzeln wurde durch die Verwendung der eingesetzten Phytohormone im Vergleich zu den Wurzeln der Kontrollpflanzen geschwächt. Die Kombinationen aus IAA und KIN sorgten für eine Erhöhung der Blattmassen. Nach 16 Wochen waren die Gehalte alle geringer als die Werte nach 8 Wochen.

Das Ethylen hat eine schädigende Wirkung auf das Wachstum der Teufelskrallen. Des Weiteren führt es nur zu einer geringen Steigerung oder Senkung der Harpagosidproduktion.

Die Kultivierung der Teufelskrallen bei einer höheren Lichtintensität führte zu einer Steigerung des Wurzel- und Blattwachstums. Allerdings erzeugte diese

Änderung eine geringere HS- Produktion in den Wurzeln, erhöhte sie aber in den Blättern. Dennoch fiel die Harpagosidproduktion im Vergleich zu den anderen Versuch sehr gering aus.

Die Mykorrhizapilze hatten in dem Zeitraum des Versuches keinen Einfluss auf das Wachstum der *ex* und *in vitro*- Pflanzen. Lediglich an den Wurzeln der *in vitro*- Pflanzen konnte eine beginnende Mykorrhizierung festgestellt werden. Eine Steigerung des Wirkstoffgehaltes in den Wurzeln war dennoch zu verzeichnen. Dagegen sank der Gehalt in Blättern. Ein größerer Gehalt kann in den Wurzeln der in Substrat eingepflanzten Teufelskrallen beobachtet werden.

9 Summary

The present work concerns studies on the behavior of devil's claws cultivated *in vitro* to stress substances, phytohormones, different lighting condition and mycorrhizal fungi. The aim was to win findings with regard to possible influential factors to increase the content of secondary metabolites harpagoside.

All contents of harpagoside in control plants have partially large fluctuations, why a low increase of value of harpagoside isn't meaningful. The values of harpagoside which belongs to the experimental plants should exceed the values of the control plants many times to be able to make significant statements.

In some Experiments the content of harpagoside could be increased. The use of 280 mM geraniol and 25 μ M abscisic acid resulted in a significant increase of the content in roots and foliage in comparison with control plants. The remaining stress substances either led to no significant increase or to a reduction of the content of harpagoside.

The values of harpagoside in plants, which were cultivated in phytohormone-containing medium, were lower than the values of the control plants for large part after 8 weeks. The use of 3 mg/l BAP causes a higher content in roots. The combination of IAA/KIN could increase the content of harpagoside in the foliage. The growth of roots was weakened because of using the phytohormones. The combination of IAA and KIN increased the leaf masses. After 16 weeks the contents of harpagoside were lower than the contents after 8 weeks.

Ethylene has a damaging effect of the growth of devil's claw. It caused only a low increase or a decrease of content of harpagoside.

Cultivation of plants by using a higher lighting intensity led to an increase of growth of roots and foliage. A higher lighting intensity causes a lower production of harpagoside in roots but a higher production in foliage.

Mycorrhizal fungi had no influence to the growth of *ex* and *in vitro*- plants in the experimental period. Only the roots of the treated *in vitro* plants showed a beginning mycorrhization. An increase of drug content was showed. The content in foliage was decrease.

Literaturverzeichnis

- Afolayan, A. J.; Adebola, P. O. (2004):** *In vitro* propagation: A biotechnological tool capable of solving the problem of medicinal plants decimation in South Africa. African Journal of Biotechnology Vol. 3 (12), pp. 683-687
- Bairu, M. W. (2008):** Characterization and control of micropropagation problems in aloe, devil's claw and banana. 167 Seiten. Pietermaritzburg. University of KwaZulu-Natal. Dissertation. Vol. 5: 75- 92
- de Klerk, G.J. (2000):** Plant hormones in tissue culture. Duchefta Biochemie by Haarlem.184: 17 - 23
- Egli, S.; Brunner, I. (2011):** Mykorrhiza. Eine faszinierende Lebensgemeinschaft im Wald. 3. Auflage. Merkbl. Prax. 35. 8 Seiten
- Europäische Arzneibuch-Kommission (2011):** Europäisches Arzneibuch. 7. Auflage. Grundwerk 2011. Band 1: Allgemeiner Teil – Monographien – gruppen. Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, 1980 S.: 1908 – 1911
- Georgiev, M.I.; Alipieva, K.; Orhan, I.E. (2011):** Cholinesterases Inhibitory and Antioxidant Activities of *Harpagophytum procumbens* from *In Vitro* Systems. Phytotherapy Research
- Georgiev, M.I.; Ivanovska, N.; Alipieva, K.; Dimitrova, P.; Verpoorte, R. (2013):** Harpagoside: from Kalahari Desert to pharmacy shelf. Phytochemistry 92. 8-15
- Grabowska, R.; Wysokinska, H. (2009):** Micropropagation of *Harpagophytum procumbens* (Burch.) DC. ex Meisn.; the effect of cytokinins on shoot multiplication. herba polonica. Vol.55. No.3
- Gromnica-Ihle, E. (2009):** Aktionsplan Rheuma. Aktualisierte Auflage 2009. Rheuma: Eine Erkrankung mit vielen Gesichtern. Deutsche Rheuma-Liga Bundesverband e.V.

- Hachfeld, B.; Schippmann, U.; Levieille, G. et al. (2000):** Focus on *Harpagophytum*. Medical Plant Conservation. Vol.6: 4- 11
- Hänsel, R.; Sticher, O. (2010):** Pharmakognosie – Phytopharmazie. Springer Verlag. 1451: 815 – 821.
- Jain, N.; Bairu, M. W.; Stirk, W. A.; Van Staden, J. (2009):** The effect of medium, carbon source and explant on regeneration and control of shoot-tip necrosis in *Harpagophytum procumbens*. South African Journal of Botany. Vol. 75: 117– 121.
- Ji, C., Boyd, C.; Slaymaker, D.; Okinaka, Y.; Takeuchi, Y.; Midland, S. L.; Sims, J. J.; Herman, E.; Keen, N. (1998):** Characterization of a 34-kDa soybean binding protein for the syringolide elicitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **95**(6): 3306-3311.
- Kaliamoorthy, S.; Naidoo, G.; Achar, P. (2008):** Micropropagation of *Harpagophytum procumbens*. Biologia Plantarum. Vol. 52 (2): 191-194
- Levieille, G.; Wilson, G. (2002):** *In vitro* propagation and iridoid analysis of the medicinal species *Harpagophytum procumbens* and *H. zeyheri*. Plant Cell Reports Vol. 21: Issue 3. 220- 225
- Taraporewala, Z. F. ; Culver, J. N. (1996):** Identification of an elicitor active site within the three-dimensional structure of the tobacco mosaic tobamovirus coat protein. Plant Cell. 8(2): 169-78.
- Vierheilig, H.; Coughlan, A.; Wyss, U.; Piché, Y. (1998):** Ink and vingar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. Applied Environmental Microbiology. 64. 5004-5007
- Wichtl, M. (2004):** Teedrogen und Phytopharmaka; Ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart. 708 Seiten

Anlagenverzeichnis

Anlage 1: Bezeichnung der HPLC- Proben.....	IX
Anlage 2: Rohdaten der HPLC- Analysen.....	XI
Anlage 3: Berechnung des Harpagosidgehaltes	XVI
Anlage 4: Chromatogramm Probe R	XVII
Anlage 5: Chromatogramm Probe XVIII.....	XVIII
Anlage 6: Chromatogramm Probe XXXVIII	XIX
Anlage 7: Chromatogramm Probe EV1 - B	XX
Anlage 8: Chromatogramm Probe VL1 - B.....	XXI
Anlage 9: Chromatogramm Probe 3.....	XXII
Anlage 10: Chromatogramm Probe 7.....	XXIII

Anlage 1: Bezeichnung der HPLC- Proben

Tabelle A1: Bezeichnung der HPLC- Proben

Probeninhalt	Bezeichnung der Wurzel	Bezeichnung des Blattwerks
Kontrolle (Stresssubstanzen VR1)	B	E
NaCl (30 mM)	A	G
CuSO ₄	C	F
Methyljasmonat	D	H
Kontrolle (Stresssubstanzen VR2)	I	N
NaCl (20 mM)	J	O
NaCl (40 mM)	K	P
Geraniol (140 mM)	L	Q
Geraniol (280 mM)	M	R
Kontrolle (Stresssubstanzen VR3)	X	d
Methyljasmonat	W	c
Methyljasmonat	V	b
Abscisinsäure	U	A
Abscisinsäure	T	Y
Abscisinsäure	S	Z
Kontrolle (Phytohormonversuch nach 8 Wochen)	I	XI
BAP (1 mg/l)	II	XII
BAP (2 mg/l)	III	XIII
BAP (3 mg/l)	IV	XIV
BAP/NAA (0,3 mg/l / 3 mg/l)	V	XV
BAP/NAA (1,5 mg/l / 1,5 mg/l)	VI	XVI
BAP/NAA (3 mg/l / 0,3 mg/l)	VII	XVII
IAA/KIN (0,1 mg/l / 5 mg/l)	VIII	XVIII
IAA/KIN (2,5 mg/l / 2,5 mg/l)	IX	XIX
IAA/KIN (5 mg/l / 0,1 mg/l)	X	XX
Kontrolle (Phytohormonversuch nach 16 Wochen)	XXI	XXXI
BAP (1 mg/l)	XXII	XXXII
BAP (2 mg/l)	XXIII	XXXIII
BAP (3 mg/l)	XXIV	XXXIV

Fortsetzung der Tabelle A1: Bezeichnung der HPLC- Proben

Probeninhalt	Bezeichnung der Wurzel	Bezeichnung des Blattwerks
BAP/NAA (0,3 mg/l / 3 mg/l)	XXV	XXXV
BAP/NAA (1,5 mg/l / 1,5 mg/l)	XXVI	XXXVI
BAP/NAA (3 mg/l / 0,3 mg/l)	XXVII	XXXVII
IAA/KIN (0,1 mg/l / 5 mg/l)	XXVIII	XXXVIII
IAA/KIN (2,5 mg/l / 2,5 mg/l)	XXIX	XXXIX
IAA/KIN (5 mg/l / 0,1 mg/l)	XXX	XXXX
Kontrolle (Ethylenversuch 1)	KEV1- W	KEV1- B
Kontrolle (Ethylenversuch 2)	KEV2- W	KEV2- B
Ethylenversuch 1	EV1- W / EV1a- W	EV1- B / EV1a- B
Ethylenversuch 2	EV2- W / EV2a- W	EV2- B / EV2a- B
Lichtintensität 40 μ E	WL1- W / WL2- W	WL1- B / WL2- B
Lichtintensität 150 μ E	VL1- W / VL2- W	VL1- B / VL2- B
Kontrolle im Medium	1 / 2	9 / 10
Mykorrhizapilzsporen im Medium	3 / 4	11 / 12
Kontrolle im Substrat	5 / 6	13 / 14
Mykorrhizapilzsporen im Substrat	7 / 8	15 / 16

Anlage 2: Rohdaten der HPLC

Tabelle A2: Ergebnisse der HPLC - Analysen

Proben- bezeichnung	Peak No.	Retentionszeit [min]	Peak Name	Height [mAU]	Area [mAU*min]
Referenz 1 mg/ml	1	6,793	Harpagosid	1243,33	531,4674
A	1	7,071	Harpagosid	6,59	2,5131
B	1	6,969	Harpagosid	6,16	2,3800
C	1	6,959	Harpagosid	4,29	1,6743
D	1	6,889	Harpagosid	3,12	1,1656
E	1	6,960	Harpagosid	41,98	16,4012
F	1	6,891	Harpagosid	32,76	12,6089
G	1	6,870	Harpagosid	12,60	4,9136
H	1	6,847	Harpagosid	11,07	4,2721
I	1	32,46	n.a.	3,265	3,295
J	1	32,59	n.a.	3,236	3,341
K	1	32,87	n.a.	3,343	3,248
L	1	32,81	n.a.	3,284	3,150
M	1	7,31	n.a.	0,433	0,224
	2	32,85	n.a.	3,509	3,315
N	1	7,33	Harpagosid	15,084	8,048
	2	33,12	n.a.	20,387	7,735
	3	35,55	n.a.	10,574	3,203
O	1	7,36	Harpagosid	23,801	12,748
	2	33,23	n.a.	18,873	7,242
	3	35,66	n.a.	10,844	2,676
P	1	7,45	Harpagosid	13,374	7,118
	2	33,16	n.a.	14,053	3,678
	3	35,62	n.a.	8,309	2,049
Q	1	7,39	Harpagosid	8,855	4,765
	2	33,19	n.a.	18,415	4,810
	3	35,63	n.a.	10,413	2,670
R	1	7,42	Harpagosid	37,668	19,752
	2	33,18	n.a.	16,899	4,349
	3	35,62	n.a.	9,596	2,452

Fortsetzung der Tabelle A2: Ergebnisse der HPLC - Analysen

Proben- bezeichnung	Peak No.	Retentionszeit [min]	Peak Name	Height [mAU]	Area [mAU*min]
S	1	7,162	Harpagosid	4,60	2,221
T	1	7,134	Harpagosid	6,70	3,212
U	1	7,088	Harpagosid	1,94	0,920
V	1	7,119	Harpagosid	3,17	1,481
W	1	7,158	Harpagosid	2,12	0,983
X	1	7,126	Harpagosid	4,00	1,852
Y	1	7,111	Harpagosid	6,32	3,110
Z	1	7,102	Harpagosid	32,96	15,771
a	1	6,907	Harpagosid	16,34	7,771
b	1	7,229	Harpagosid	7,11	3,583
c	1	7,218	Harpagosid	4,24	2,074
d	1	7,202	Harpagosid	48,82	24,110
I	1	7,345	Harpagosid	26,44	13,190
II	1	7,348	Harpagosid	8,00	3,971
III	1	7,135	Harpagosid	20,57	10,153
IV	1	7,030	Harpagosid	21,19	10,188
V	1	7,107	Harpagosid	7,72	3,641
VI	1	7,027	Harpagosid	5,42	2,513
VII	1	6,998	Harpagosid	11,53	5,592
VIII	1	7,025	Harpagosid	32,94	15,700
IX	1	7,022	Harpagosid	30,80	14,669
X	1	7,024	Harpagosid	34,62	16,667
XI	1	6,898	Harpagosid	33,20	15,893
XII	1	6,965	Harpagosid	28,79	14,225
XIII	1	6,978	Harpagosid	31,70	15,801
XIV	1	6,937	Harpagosid	23,41	11,285
XV	1	6,870	Harpagosid	23,31	11,485
XVI	1	6,734	Harpagosid	16,99	7,874
XVII	1	6,939	Harpagosid	9,19	4,341
XVIII	1	6,966	Harpagosid	70,73	34,381
XIX	1	6,880	Harpagosid	28,10	13,401
XX	1	6,923	Harpagosid	52,15	25,869
XXI	1	7,232	Harpagosid	7,80	3,956
XXII	1	7,128	Harpagosid	1,67	0,580

Fortsetzung der Tabelle A2: Ergebnisse der HPLC - Analysen

Proben- bezeichnung	Peak No.	Retentionszeit [min]	Peak Name	Height [mAU]	Area [mAU*min]
XXIII	1	7,082	Harpagosid	12,53	6,021
XXIV	1	7,059	Harpagosid	11,93	6,200
XXV	1	7,002	Harpagosid	7,45	3,701
XXVI	1	6,978	Harpagosid	4,02	1,825
XXVII	1	7,046	Harpagosid	11,56	5,777
XXVIII	1	7,013	Harpagosid	9,76	4,691
XXIX	1	7,007	Harpagosid	8,80	4,153
XXX	1	7,282	Harpagosid	16,79	7,876
XXXI	1	7,015	Harpagosid	21,88	11,030
XXXII	1	7,028	Harpagosid	26,54	12,842
XXXIII	1	7,025	Harpagosid	16,85	8,187
XXXIV	1	6,980	Harpagosid	44,12	21,761
XXXV	1	7,063	Harpagosid	40,01	19,468
XXXVI	1	7,199	Harpagosid	13,13	6,634
XXXVII	1	7,145	Harpagosid	15,04	7,736
XXXVIII	1	7,145	Harpagosid	42,20	21,052
XXXIX	1	7,135	Harpagosid	37,98	18,737
XL	1	7,119	Harpagosid	24,74	12,231
KEV1-W	1	7,092	Harpagosid	6,22	3,028
KEV2-W	1	7,10	Harpagosid	2,81	1,384
EV1-W	1	7,091	Harpagosid	6,09	3,040
EV1a-W	1	7,060	Harpagosid	3,27	1,498
EV2-W	1	7,010	Harpagosid	7,42	3,763
EV2a-W	1	7,017	Harpagosid	5,56	2,762
KEV1-B	1	6,936	Harpagosid	35,37	17,363
KEV2-B	1	6,973	Harpagosid	40,47	19,690
EV1-B	1	6,91	Harpagosid	12,21	6,533
EV1a-B	1	6,970	Harpagosid	15,46	7,293
EV2-B	1	6,867	Harpagosid	27,85	13,347
EV2a-B	1	6,803	Harpagosid	37,70	17,976
VL1-W	1	7,25	Harpagosid	1,05	0,407
	2	33,04	n.a.	18,21	4,729
	3	35,53	n.a.	15,37	3,712

Fortsetzung der Tabelle A2: Ergebnisse der HPLC - Analysen

Proben- bezeichnung	Peak No.	Retentionszeit [min]	Peak Name	Height [mAU]	Area [mAU*min]
VL2-W	1	7,14	Harpagosid	1,46	0,659
	2	32,98	n.a.	19,76	5,322
	3	35,33	n.a.	15,45	3,699
WL1-W	1	7,19	Harpagosid	1,43	0,630
	2	33,04	n.a.	20,46	5,463
	3	35,52	n.a.	17,78	4,270
WL2-W	1	7,15	Harpagosid	1,19	0,560
	2	33,03	n.a.	20,78	5,619
	3	35,52	n.a.	18,18	4,455
VL1-B	1	7,21	Harpagosid	54,60	26,675
	2	32,99	n.a.	13,76	3,514
	3	35,52	n.a.	12,64	3,096
VL2-B	1	7,16	Harpagosid	33,70	17,291
	2	32,99	n.a.	18,98	5,001
	3	35,48	n.a.	17,05	4,169
WL1-B	1	7,20	Harpagosid	22,22	11,153
	2	33,02	n.a.	20,32	5,378
	3	35,51	n.a.	17,13	4,157
WL2-B	1	7,19	Harpagosid	31,96	16,194
	2	33,00	n.a.	17,39	4,510
	3	35,49	n.a.	15,04	3,633
1	1	6,776	Harpagosid	8,61	4,0715
2	1	6,832	Harpagosid	9,22	4,2986
3	1	6,808	Harpagosid	13,50	6,2920
5	1	6,843	Harpagosid	27,27	12,8864
6	1	6,981	Harpagosid	3,60	1,5920
7	1	6,991	Harpagosid	79,20	36,4613
	2	32,752	n.a.	21,84	5,8501
	3	35,212	n.a.	21,12	5,5964
9	1	6,961	Harpagosid	38,97	18,9536
10	1	7,008	Harpagosid	53,54	25,9317
11	1	6,988	Harpagosid	42,05	20,0304
	2	32,814	n.a.	16,35	4,2591
	3	35,283	n.a.	15,38	3,6352

Fortsetzung der Tabelle A2: Ergebnisse der HPLC - Analysen

Proben- bezeichnung	Peak No.	Retentionszeit [min]	Peak Name	Height [mAU]	Area [mAU*min]
12	1	7,013	Harpagosid	33,99	16,0738
	2	32,811	n.a.	11,08	2,8413
	3	35,289	n.a.	11,48	2,7140
13	1	6,972	Harpagosid	70,40	33,7516
	2	32,779	n.a.	21,84	5,6661
	3	35,242	n.a.	18,92	4,4859
14	1	7,003	Harpagosid	50,52	23,5227
	2	32,981	n.a.	14,66	3,7688
	3	35,484	n.a.	13,01	3,0897
15	1	7,207	Harpagosid	25,42	12,0088
	2	32,916	n.a.	13,79	3,5761
	3	35,408	n.a.	12,91	3,0838
16	1	7,173	Harpagosid	44,38	21,9006
	2	32,951	n.a.	17,98	4,7242
	3	35,453	n.a.	16,73	3,9950

Anlage 3: Berechnung des Harpagosidgehaltes

Berechnung des Faktors x:

$$\text{Faktor x: } x = y * \frac{c(H)}{c(F)}$$

- x - zu berechnender Faktor
- c(H) - Konzentration der Referenz Harpagosid
- y - Faktor, der sich auf c(F) bezieht
- c - Konzentration, die sich auf y bezieht
→ Faktor 1000 (y) bezieht sich auf die Konzentration 0,1 mg/ml (c(F)) (lt. Ph. Eur.)

Berechnung des angepassten Faktors

$$y = 1000$$

$$c(H) = 6 \text{ mg/ml}$$

$$c(F) = 0,1 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Faktor x: } x = 1000 * \frac{6 \text{ mg/ml}}{0,1 \text{ mg/ml}}$$

$$\underline{\underline{x = 60000}}$$

Beispielrechnung der Probe A

$$A1 = 2,5131 \quad (\text{entnommen aus Anlage 1: Tabelle A1: „A“})$$

$$A2 = 531,4674 \quad (\text{entnommen aus Anlage 1: Tabelle A1: „Referenz“})$$

$$m1 = 230 \text{ mg} \quad (\text{Einwaage der Probe})$$

$$m2 = 0,09 \text{ mg} \quad (\text{Berechnung aus } c(F) \text{ und der verwendeten Volumina von } V = 15 \text{ ml})$$

$$F = 60000 \quad (\text{abhängig von der Masse der Probe})$$

$$A = \frac{2,5131 \text{ mAU} * \cancel{min} * 0,09 \text{ mg} * 60000}{531,4674 \text{ mAU} * \cancel{min} * 230 \text{ mg}} = 0,111\%$$

$$\underline{\underline{A = 1,11 \text{ mg/g Trockenmasse}}}$$

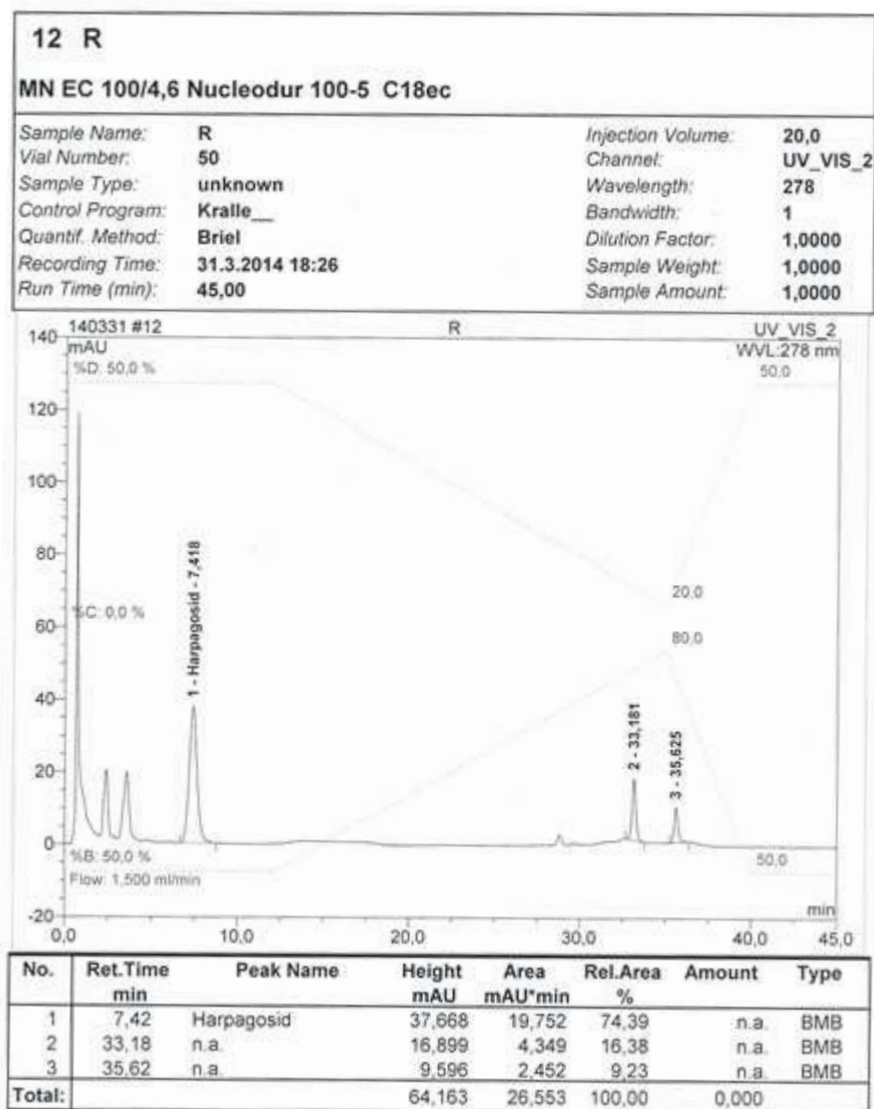
Anlage 4: Chromatogramm Probe R

Abb. A: Chromatogramm der Probe R

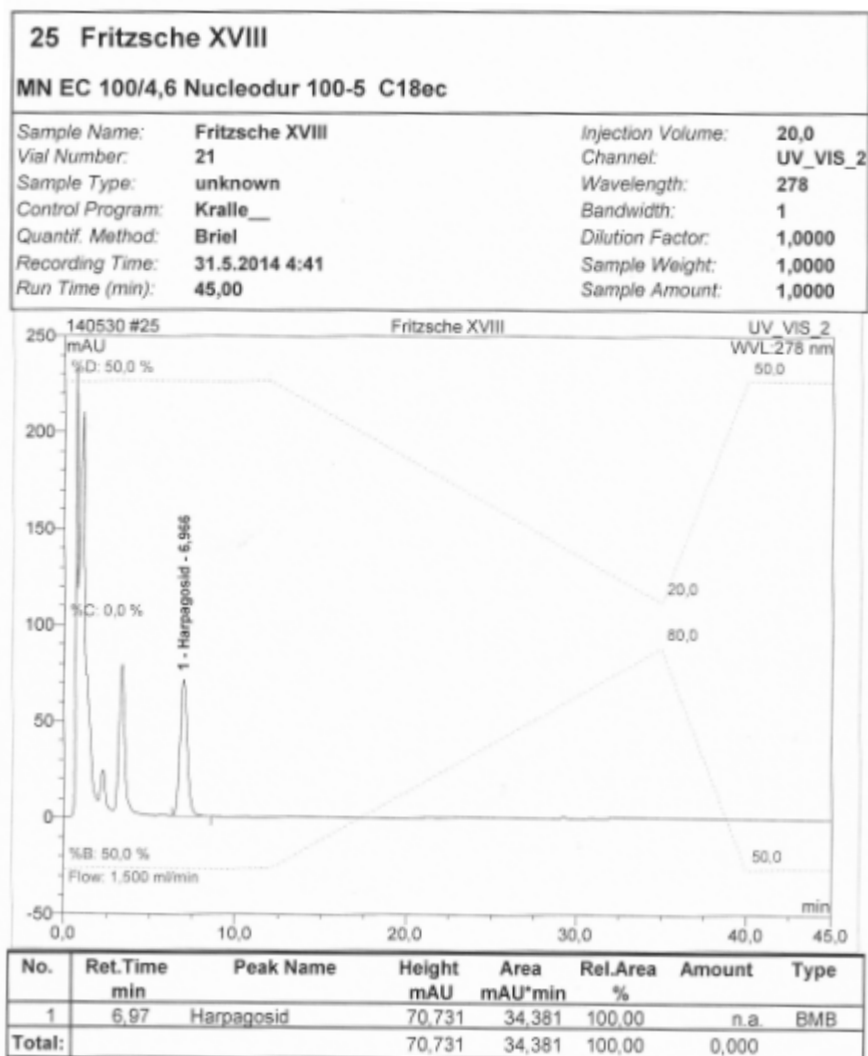
Anlage 5: Chromatogramm Probe XVIII

Abb. B: Chromatogramm der Probe XVIII

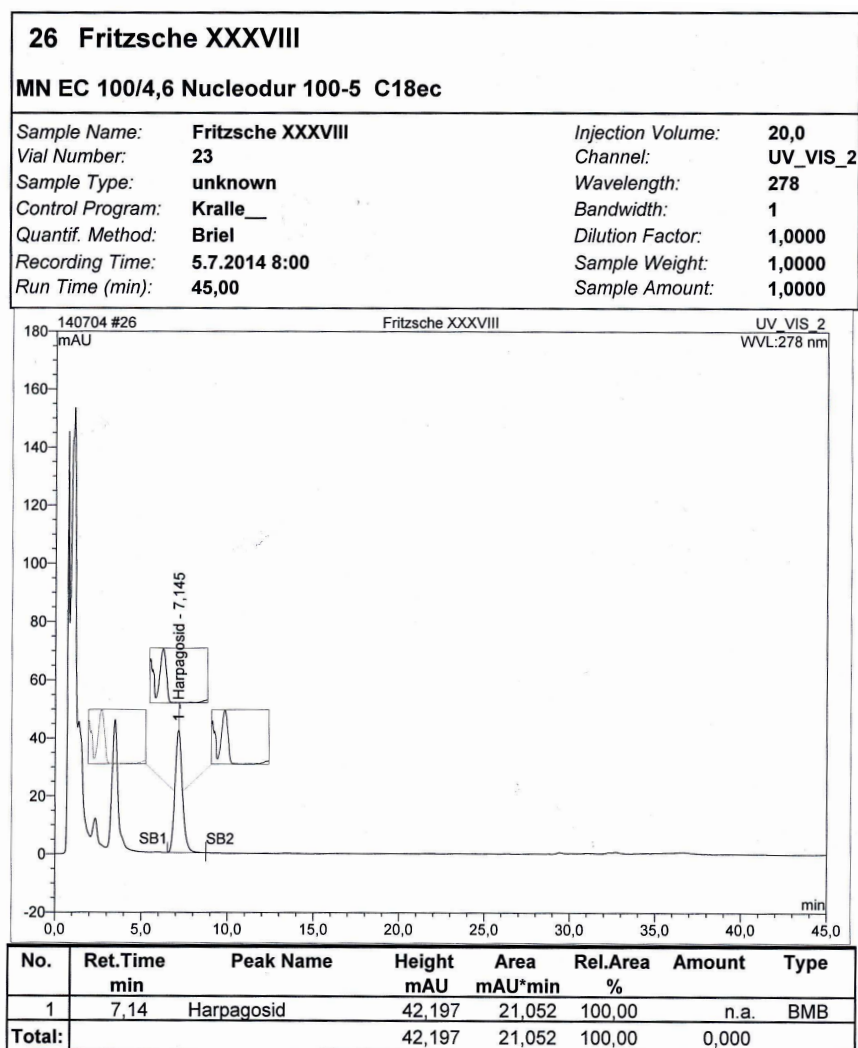
Anlage 6: Chromatogramm Probe XXXVIII

Abb. C: Chromatogramm der Probe XXXVIII

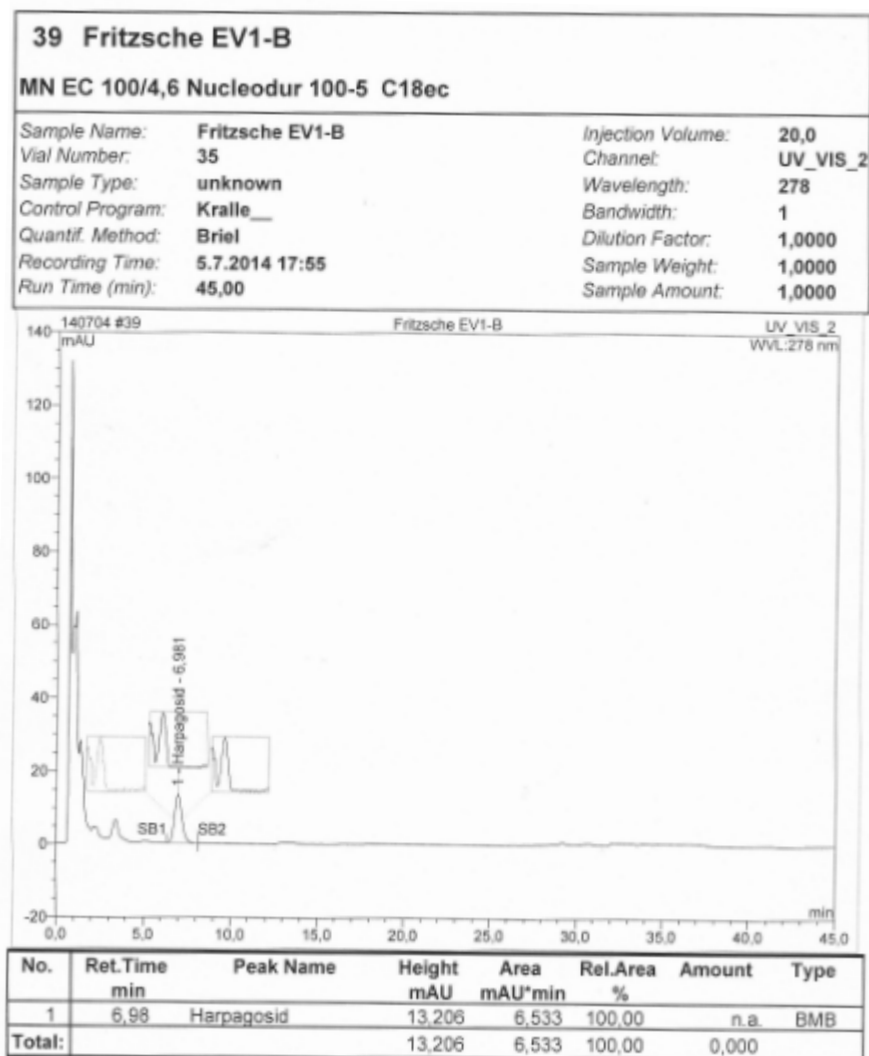
Anlage 7: Chromatogramm Probe EV1-B

Abb. D: Chromatogramm der Probe EV1-B

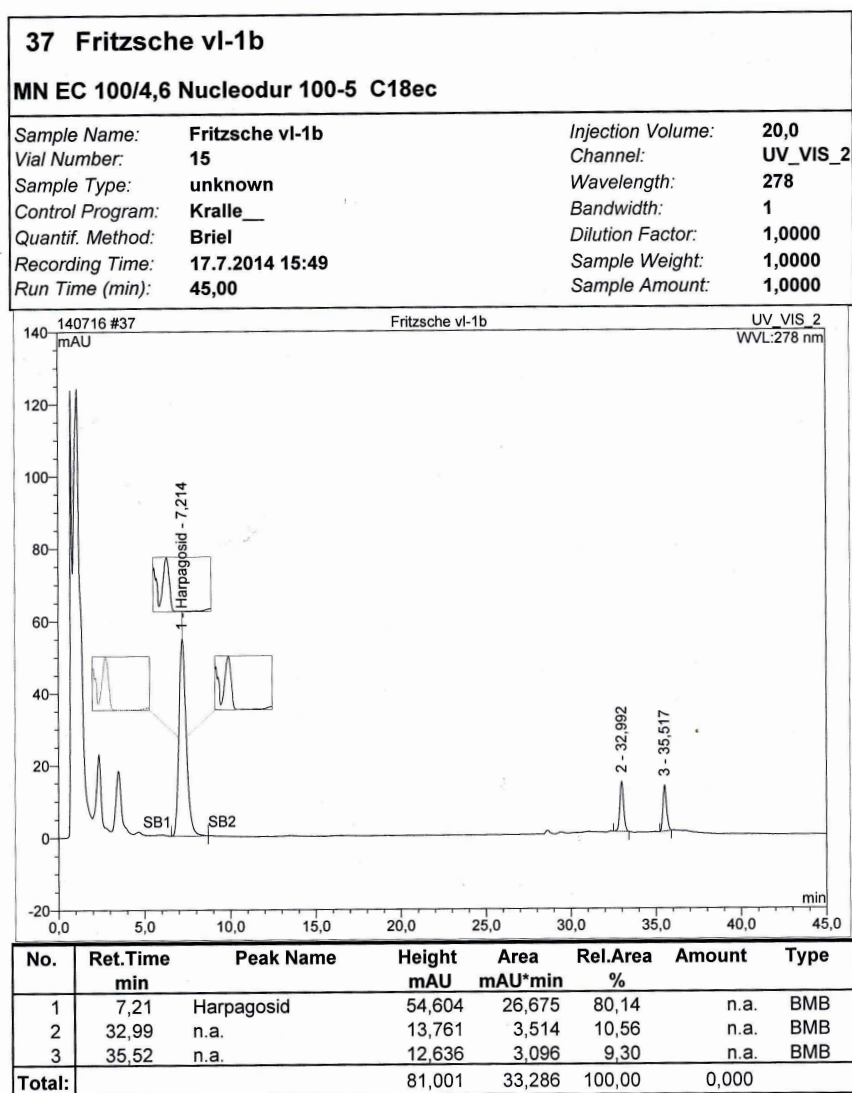
Anlage 8: Chromatogramm Probe VL1- B

Abb. E: Chromatogramm der Probe VL1- B

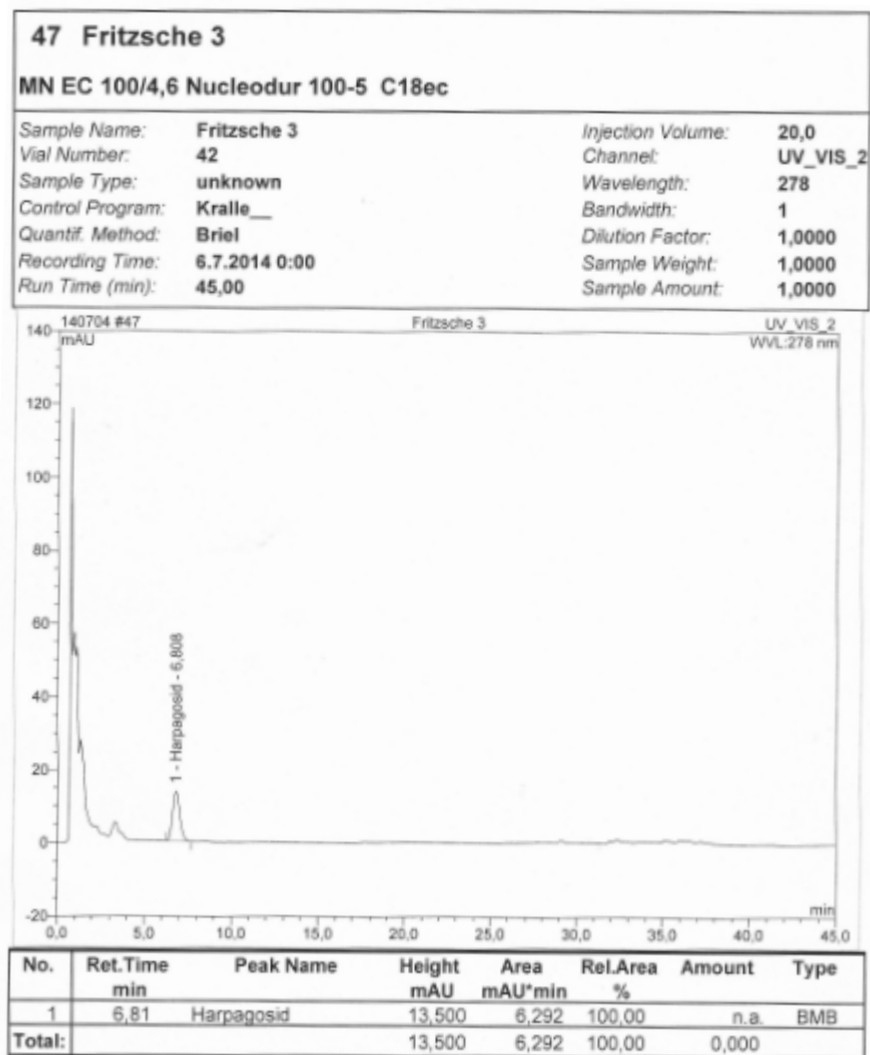
Anlage 9: Chromatogramm Probe 3

Abb. F: Chromatogramm der Probe 3

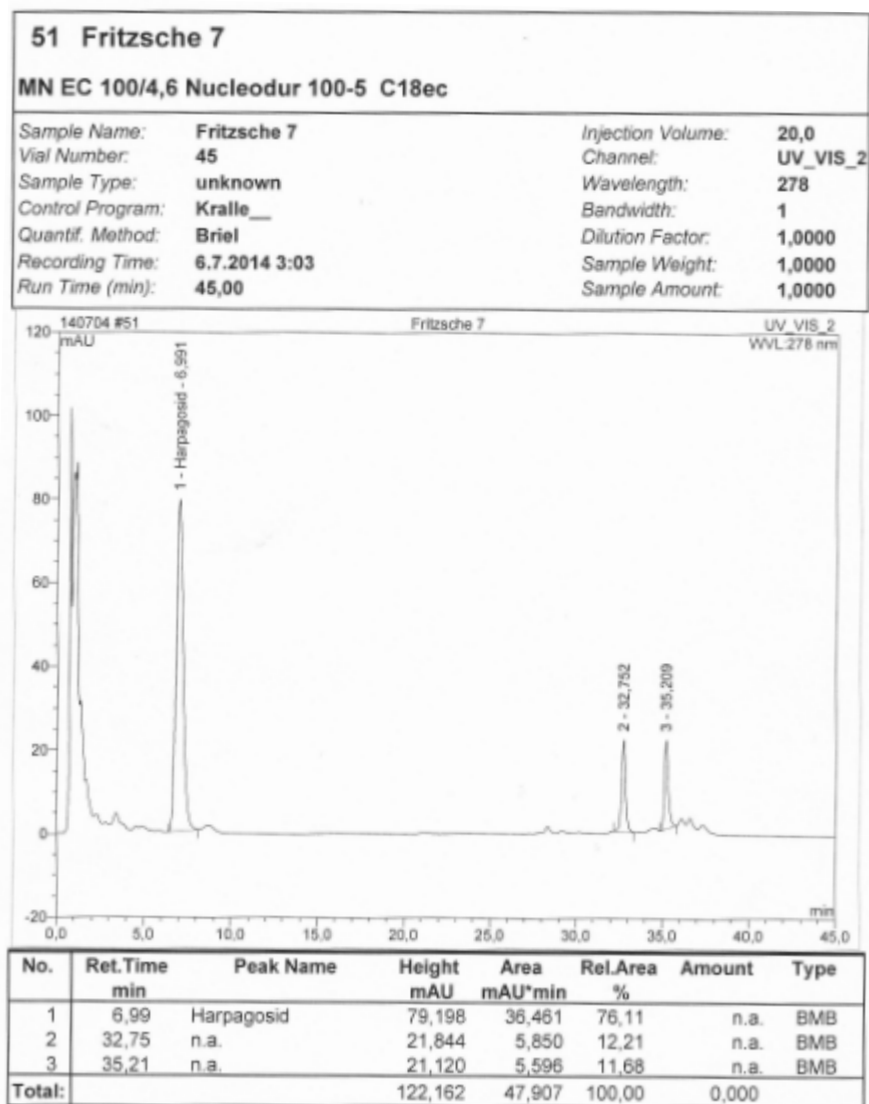
Anlage 10: Chromatogramm Probe 7

Abb. G: Chromatogramm der Probe 7

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Mittweida, den 25.07.2014

Eric Fritzsche